



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C07K 14/47, C12N 15/12, 5/10, 15/86,</b> <b>C07K 16/18</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 99/21886</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 6 mai 1999 (06.05.99)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/02278  <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 octobre 1998 (23.10.98)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/13384      24 octobre 1997 (24.10.97)      FR 60/095,671      7 août 1998 (07.08.98)      US  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> CZECH, Christian [DE/FR]; 4, Cité de l'Alma, F-75007 Paris (FR). MERCKEN, Luc [BE/FR]; 18 bis, rue Jules Joffrin, F-94100 Saint Maur (FR). PRADIER, Laurent [FR/FR]; 23, avenue Cambacérès, F-91370 Verrières (FR). REBOUL-BECQUART, Soline [FR/FR]; 10, avenue de Verdun, F-92120 Montrouge (FR).  <b>(74) Mandataire:</b> LANCELOT, Géraldine; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AT, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> PEPTIDES CAPABLE OF INHIBITING THE INTERACTION BETWEEN PRESENILINS AND THE $\beta$ -AMYLOID PEPTIDE OR ITS PRECURSOR		
<b>(54) Titre:</b> PEPTIDES CAPABLES D'INHIBER L'INTERACTION ENTRE LES PRESENILINES ET LE PEPTIDE $\beta$ -AMYLOÏDE OU SON PRECURSEUR		
<b>(57) Abstract</b>  The invention concerns novel peptide and nucleotide sequences, and their pharmaceutical use. More particularly, the invention concerns novel polypeptides capable of inhibiting at least partially the interaction between presenilin 1 or presenilin 2 and the $\beta$ -amyloid peptide precursor and/or the $\beta$ -amyloid peptide. The invention also concerns the preparation of in vitro tests for detecting molecules and in particular molecules capable of inhibiting said interaction.		
<b>(57) Abrégé</b>  La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et nucléotidiques, et leur utilisation pharmaceutique. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 d'une part et le précurseur du peptide $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide $\beta$ -amyloïde d'autre part. La présente invention concerne aussi l'élaboration de tests in vitro pour la mise en évidence de molécules et en particulier de petites molécules capables d'inhiber cette interaction.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PEPTIDES CAPABLES D'INHIBER L'INTERACTION ENTRE LES PRESENILINES ET LE PEPTIDE  $\beta$ -AMYLOÏDE OU SON PRECURSEUR

5

La présente invention concerne de nouvelles séquences peptidiques et nucléotidiques. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 d'une part et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde d'autre part. La présente invention concerne aussi l'élaboration de tests in vitro pour la mise en évidence de molécules et en particulier de petites molécules capables d'inhiber cette interaction.

Le peptide amyloïde A $\beta$ , de 37 à 42 acides aminés, est le principal composant protéique des plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Ce peptide est produit par clivage de son précurseur, la protéine précurseur de peptide amyloïde (APP). Des mutations dans le gène de l'APP sont responsables de certaines formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer. Cependant la majorité de ces formes sont liées à la présence de mutations sur deux gènes, présénilines PS1 (initialement nommé S182) et PS2 (initialement STM2), récemment identifiés par clonage positionnel (Hardy, 1997). Ces formes sont dominantes et ces anomalies correspondent toutes à des mutations faux-sens à l'exception d'une entraînant la délétion d'un exon. Les présénilines sont des protéines hydrophobes membranaires d'environ 45-50 kDa de masse moléculaire et qui présentent 67% d'identité entre elles. Elles sont homologues à deux protéines de *C. elegans*, SPE4 et Sel-12, qui sont impliquées de façon indirecte respectivement dans le transport intracellulaire et dans la signalisation des récepteurs Notch. Cependant, la fonction physiologique des présénilines est encore inconnue. L'implication dans la maladie d'Alzheimer, de deux protéines si voisines, laisse à penser que les présénilines contribuent à une voie physiologique essentielle dans l'étiologie de cette pathologie.

30

La protéine PS1 comprend 467 acides aminés et PS2 448. Toutes deux présentent la structure d'une protéine membranaire avec de 6 à 8 domaines transmembranaires potentiels. Chacune des présénilines est sujette *in vivo* à un clivage protéolytique précis résultant en deux fragments généralement dénommés fragments N(amino)- et C(carboxy)-terminaux (Thinakaran et col., 1996). Ce clivage a été cartographié entre les résidus 291 et 299 de PS1 (Podlisny et col., 1997) et dans une région homologue de PS2. On entend donc en général par fragment N-terminal (N-ter), le fragment de la position 1 à approximativement 291 de PS1 et par fragment C-terminal, le complément. Bien que la topologie exacte des présénilines dans les membranes lipidiques ne soit pas clairement établie, il est proposé que leurs extrémités N- et C-terminales<sub>RC1</sub>, ainsi que la grande boucle hydrophile, soient présentes dans le compartiment cytosolique (Doan et col., 1996, voir schéma figure 1).

Il a maintenant été démontré que les formes mutées des présénilines induisent l'augmentation de la production du peptide amyloïde long A $\beta$  1-42 par rapport à celle de A $\beta$  1-40 autant chez les patients porteurs (Scheuner et coll., 1996), qu'en cellules transfectées (Borchelt et coll., 1996) ou en souris transgéniques (Duff et coll., 1996). Le peptide amyloïde A $\beta$ , qui forme les plaques séniles, lésions caractéristiques de la pathologie, et ses différentes formes sont dérivés du catabolisme de la protéine précurseur de l'amyloïde, APP. En particulier, deux formes essentielles du peptide amyloïde ont été décrites, une de quarante résidus, A $\beta$ 40, et l'autre possédant deux résidus supplémentaires en son carboxy terminal, A $\beta$ 42. *In vitro*, le peptide A $\beta$  présente de fortes propriétés d'agrégation qui sont accrues pour la forme A $\beta$ 42 et ce dernier semble effectivement former les premiers agrégats détectables dans la pathologie. Par ailleurs, la forme A $\beta$ 42 est spécifiquement produite après trauma crânien chez l'homme, lequel constitue un des facteurs de risques environnementaux les mieux établis de la maladie d'Alzheimer. De plus, les formes génétiques précoces de la maladie liées à des mutations autant sur l'APP (il y en a six) que maintenant sur les

présénilines 1 et 2, concourent toutes à une augmentation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. L'ensemble de ces facteurs semble désigner le A $\beta$ 42 comme l'agent clé de la pathologie autant dans les formes génétiques que sporadiques de la maladie et l'élucidation de son mécanisme de formation est devenu une question  
5 fondamentale.

A cet égard, la formation de complexe dans la même enveloppe cellulaire entre le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et PS1 ou PS2 a été rapportée (Weidemann et al. 1997, Xia et al., 1997) cependant on ne connaît pas la nature précise des événements responsables de la production du peptide  $\beta$ -amyloïde et  
10 aucun lien n'a encore pu être établi entre le rôle possible de ces complexes et la production du peptide  $\beta$ -amyloïde A $\beta$ 42. Il est néanmoins important de remarquer que le peptide A $\beta$ 42, mais non pas le A $\beta$ 40, semble être localisé dans le reticulum endoplasmique dans les cellules neuronales (Hartmann et al., 1997).

La présente invention résulte de l'identification et de la caractérisation par  
15 la demanderesse de régions particulières de la préséniline 1 (PS1) et de la préséniline 2 (PS2), ainsi que de régions particulières du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP) impliquées dans la formation de complexes APP/PS1 et APP/PS2.

La présente invention découle en particulier de la mise en évidence de la capacité de la région N-terminale hydrophile (acides aminés 1-87) de la PS2 à  
20 reconnaître différents domaines de APP. Elle découle en outre de la mise en évidence de propriétés similaires pour la région N-terminale de PS1 (fragment 1-213). Elle résulte également de la démonstration de la capacité des polypeptides dérivés des régions des présénilines définies ci-avant à inhiber la formation des complexes entre l'APP et les présénilines. Les présénilines de la présente demande  
25 correspondent essentiellement à la préséniline 1 (PS1) et/ou à la préséniline 2 (PS2).

La présente invention résulte en outre de la mise en évidence de la localisation cellulaire particulière, non attendue, des régions en interaction par

rapport à la membrane lipidique. Elle découle plus particulièrement du fait que ces interactions peuvent prendre place non seulement au niveau membranaire mais également au niveau de la lumière du reticulum endoplasmique et dans le compartiment extracellulaire. Ceci est inattendu dans la mesure où la région N-terminale des PS (impliquée dans l'interaction) est généralement considérée  
5 comme étant localisée dans le cytoplasme dans des conditions standard.

La caractérisation des domaines d'interaction de l'APP et des présénilines et la mise en évidence des différentes localisations cellulaires de ces interactions permettent d'envisager la préparation de nouveau polypeptides utilisables  
10 pharmaceutiquement.

10 Un premier objet de l'invention concerne donc des polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.

Au sens de capable d'inhiber l'interaction, on entend que la présence des polypeptides de l'invention et/ou des ligands et/ou molécules mis en évidence à l'aide du procédé de l'invention, suffisent à inhiber au moins partiellement la dite  
15 interaction entre une préséniline et/ou son extrémité N-Terminale et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde et de préférence le peptide  $A\beta_{1-42}$ .

Il est démontré dans les exemples de la présente demande que l'inhibition  
20 de cette interaction avec un des polypeptides de l'invention, conduit à la diminution de la production du peptide amyloïde intracellulaire  $A\beta_{1-42}$ . Cette conséquence fonctionnelle est donc envisagée pour tout polypeptide de l'invention et/ou ligands et/ou molécules mis en évidence à l'aide du procédé de l'invention. Inhiber cette interaction et donc inhiber la production de  $A\beta_{1-42}$ , représente par conséquent une  
25 cible thérapeutique de choix dans les maladies impliquant cette forme du peptide amyloïde.

Selon un mode particulier, les polypeptides selon l'invention comportent au moins une partie de la préséniline 2 (PS2) permettant l'interaction avec le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. De manière préférée, les polypeptides selon l'invention sont caractérisés en ce que la partie de PS2 correspond au fragment N-terminal hydrophile de PS2. Plus préférentiellement les polypeptides selon l'invention comprennent tout ou partie de la séquence correspondant à la séquence SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

Selon un autre mode de réalisation, les polypeptides selon l'invention comportent au moins une partie de PS1 permettant l'interaction avec le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. De manière préférée les polypeptides selon l'invention comprennent tout ou partie de la séquence correspondant à la séquence SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

Selon un autre mode de réalisation les polypeptides selon l'invention comprennent au moins les régions d'homologie communes correspondant aux séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

Selon un autre mode de réalisation les polypeptides selon l'invention comportent au moins une partie du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde (APP). De manière préférée, les polypeptides selon l'invention comportent une partie de l'APP hormis la région correspondant au peptide  $\beta$ -amyloïde. Encore plus préférentiellement, les polypeptides sont caractérisés en ce que la partie du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde comprend tout ou partie du fragment 1-596. Plus préférentiellement, les polypeptides selon l'invention comportent tout ou partie d'une séquence choisie parmi la séquence correspondant au fragment 1-596 de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

Au sens de la présente invention, le terme séquence polypeptidique dérivée désigne toute séquence polypeptidique différant des séquences polypeptidiques

correspondant aux séquences présentées en SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, et possédant la capacité d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés peuvent être

5  
généralisés dans des buts différents, tels que notamment celui d'augmenter l'affinité du peptide pour son site d'interaction, celui d'améliorer son niveau de production, celui d'augmenter sa résistance aux protéases, celui d'augmenter son efficacité thérapeutique ou de réduire ses effets secondaires, ou celui de lui conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

10

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs polypeptidiques décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules qui inhibent au moins partiellement l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde, et qui soient non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation de polypeptides tels que décrits ci-avant pour la préparation de molécules non peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des éléments structuraux de ces polypeptides qui sont importants pour leur activité et reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

15  
20  
25

Les polypeptides selon l'invention doivent comprendre des séquences permettant une localisation cellulaire précise afin d'inhiber l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.



Préférentiellement ce sont les polypeptides dérivés de SEQ ID 1 et SEQ ID 2 qui comprennent des séquences de localisation cellulaire exogène et de manière encore plus préférée un polypeptide comprenant l'extrémité N-Terminale de PS1 ou de PS2. Parmi ces séquences on peut citer les séquences de peptide signal telles que la

5 séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal des sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine musculaires et centraux etc...

Parmi les polypeptides particulièrement intéressants on peut cité un polypeptide comprenant les 87 premiers résidus de l'extrémité N-Terminale de PS2

10 et le peptide signal de IgkB.

La présente invention a également pour objet toute séquence nucléotidique codant pour un peptide capable d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. Selon un mode particulier, il s'agit d'une séquence

15 nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci. Selon un autre mode, il s'agit d'une séquence nucléotidique comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci. De manière préférée, il s'agit d'une séquence nucléotidique comprenant les zones d'homologies communes aux

20 séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2. Selon un autre mode, il s'agit de la séquence nucléotidique correspondant au fragment 1-596 (acides nucléiques 1 à 1788) de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

Au sens de la présente invention, le terme séquence nucléotidique dérivée

25 désigne toute séquence différant de la séquence considérée en raison de la dégénérescence du code génétique, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, ainsi que toute séquence hybridant avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et codant pour un polypeptide selon

l'invention. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. Le terme dérivé comprend également les séquences homologues à la séquence considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes. De telles séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banque d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde, la séquence native ou un fragment de celle-ci, dans des conditions variables d'hybridation (Maniatis et al. 1982).

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de séquences présentées ci-avant. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origines par des techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. D'une manière générale les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute technique connue de l'homme du métier.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de préparation des polypeptides de l'invention selon lequel on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'invention, dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit. Dans ce cas, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, terminateurs, séquence leader de sécrétion, etc.) peut varier en

fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonomes chez l'hôte choisi.

- 5 S'agissant de vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés, par exemple, en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformées avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'invention. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*,  
10 *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, de neuroblastomes humains etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

- 15 Selon un mode préféré, les cellules hôtes sont avantageusement représentées par des souches de levures recombinantes pour l'expression des acides nucléiques de l'invention ainsi que la production des protéines dérivées de ceux-ci.

Préférentiellement, les cellules hôtes comprennent au moins une séquence ou un fragment de séquence choisis parmi les séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N° 2, ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3 pour la production des polypeptides selon l'invention.

25

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées dans le cadre de thérapies géniques notamment grâce à l'ajout d'un peptide signal pour les dérivés de SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, pour la production et le transfert in vivo

de polypeptides capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. En effet, de manière inattendue, il est mis en évidence dans la présente demande qu'un peptide signal est nécessaire à l'adressage dans la lumière  
5 du réticulum endoplasmique des polypeptides de l'invention et pour conférer ainsi aux polypeptides dérivés des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 une activité biologique dans le but d'inhiber l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les séquences  
10 nucléotidiques de l'invention sont utilisées pour la construction d'une cassette d'expression, utilisable dans un vecteur d'expression. En particulier, la cassette d'expression sert à la production des polypeptides selon l'invention.

Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus,  
15 incorporée ou non dans un ADN recombinant, en utilisant les techniques connues de l'homme du métier, ou par une combinaison de ces techniques.

Préférentiellement, les séquences nucléiques selon l'invention font partie d'un vecteur utile pour induire in vivo, ex vivo et/ou in vitro l'expression des polypeptides revendiqués. Le vecteur utilisé peut être d'origines diverses, dès lors  
20 qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules nerveuses humaines. Il peut s'agir de vecteur viral, non viral ou d'un vecteur plasmidique. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut dériver des adénovirus, rétrovirus, virus adéno-associés (AAV), du virus de l'herpès, du cytomégalovirus (CMV), du virus de la vaccine,  
25 etc. Des vecteurs dérivés des adénovirus, des rétrovirus, ou des AAV incorporant des séquences d'acides nucléiques hétérologues ont été décrits dans la littérature

[Akli et al., Nature Genetics 3 (1993) 224 ; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241 ; EP 185 573, Levrero et al., Gene 101 (1991) 195 ; Le Gal la Salle et al., Science 259 (1993) 988 ; Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211 ; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353 ; Chiocca et al.,  
5 New Biol. 2 (1990) 739 ; Miyanohara et al., New Biol. 4 (1992) 238 ; WO91/18088].

La présente invention concerne donc également tout virus recombinant comprenant, insérée dans son génome, une séquence nucléique telle que définie avant et codant pour un polypeptide de l'invention.

10           Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit  
15 éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par l'acide nucléique de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsulation des particules virales.

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de  
20 l'invention sous forme incorporée à un adénovirus, un AAV ou un rétrovirus recombinant défectif. Selon un mode de réalisation préféré, il s'agit d'un adénovirus.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les

5 adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-

10 800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte. Préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion

15 partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode

20 de réalisation préféré, il comprend une délétion dans la région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et la séquence codante. Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5. Selon un autre mode de réalisation préféré, la séquence d'acide nucléique exogène est insérée au niveau de la délétion

25 dans la région E1.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la séquence nucléotidique telle que définie ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460). Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente demande a également pour objet des virus recombinants défectifs comprenant une séquence nucléique hétérologue codant pour un polypeptide selon l'invention.

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragment d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier ces anticorps peuvent être préparés par immunisation d'un animal contre un polypeptide dont la séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3, puis prélèvement du sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation

d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art. Les anticorps ou fragment d'anticorps selon l'invention peuvent notamment être utilisés pour inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.

- 5           Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables de moduler ou d'inhiber au moins en partie l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. En particulier, le procédé est utilisable comme test de criblage de molécules pour identifier de tels composés inhibiteurs.
- 10           Ce test repose en particulier sur la détection de l'inhibition de l'interaction d'une manière générale entre les présénilines (1 ou 2) et l'APP ou le peptide  $A\beta$  et d'une manière particulière entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2. En effet, à l'aide de protéines marqueur fixées aux présénilines ou des fragments de celles-ci et de systèmes de révélation appropriés et notamment par
- 15 immunoprécipitation, utilisation de chromophores ou fluophores, il est tout à fait possible de détecter une inhibition dans l'interaction des protéines ou fragments de celles-ci, précédemment cités. Un tel procédé comprend donc au moins une étape de marquage des présénilines et/ou de l'APP ou des fragments de ceux-ci et une
- 20 étape de détection de l'inhibition de l'interaction soit entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-terminale des présénilines et préférentiellement PS2, soit entre les protéines complètes APP et présénilines.

Selon un premier mode de réalisation du procédé, la mise en évidence et/ou identification de tels composés est réalisée selon les étapes suivantes :

- 25           - Le peptide  $A\beta_{1-42}$  est absorbé au préalable sur une membrane de nitrocellulose par incubation.



- un extrait bactérien contenant tout ou partie d'une préséniline (PS1 ou PS2) et avantageusement l'extrémité N-Terminale, est ensuite ajouté pour incubation avec la molécule ou un mélange contenant différentes molécules à tester

5 - Après lavages, l'interaction de la préséniline avec le peptide  $A\beta_{1-42}$  sur le filtre de nitrocellulose est mise en évidence à l'aide de protéines marqueur des présénilines. Les molécules recherchées inhibent l'interaction et diminuent donc l'intensité du signal des protéines marqueur.

Les protéines marqueur utilisées sont avantageusement a) la protéine fixatrice du S-tag, couplée à la phosphatase alcaline ou à un chromophore fluorescent, ou b) un anticorps anti-PSNT c'est-à-dire dirigé contre l'extrémité N-Terminal d'une préséniline.

10

Selon une autre mode de réalisation du procédé, la recherche de nouveaux composés est effectuée de la manière suivante :

15 - le peptide  $A\beta_{42}$  incubé au préalable sur une plaque contenant des puits (format 96 puits ou supérieur)

- l'extrémité N-terminale d'une préséniline recombinante purifiée est ensuite ajoutée avec la molécule ou un mélange contenant différentes molécules à tester, pour incubation

20 - Après lavages, l'interaction de la préséniline avec le peptide  $A\beta_{1-42}$  dans la plaque est mise en évidence à l'aide de protéines marqueur des présénilines. La perte de l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde est détectée par spectrophotométrie.

Dans le cas précis de l'utilisation de la protéine fixatrice du S-tag couplée à la phosphatase alcaline comme protéine marqueur, après révélation avec un substrat colorimétrique, le signal est détecté à 450 nm .

5 Selon un mode de réalisation avantageux et préféré du procédé, la mise en évidence et/ou l'isolement de composés capables de moduler ou d'inhiber au moins en partie l'interaction d'une manière générale entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde et d'une manière particulière entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2, est réalisé selon les étapes suivantes:

10 - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules avec le peptide  $A\beta_{1-42}$  synthétisé avec une biotine et un bras de 3  $\beta$ Alanines (ou de 3 lysines) à son extrémité N-terminale (en amont de la position 1)

15 - on incube le mélange réactionnel précédent avec l'extrémité N-terminale d'une préséniline purifiée marquée à l'aide d'un premier fluorophore. Avantagusement, le fluorophore est le cryptate d'Europium

20 - on ajoute la streptavidine (qui se fixera sur la biotine du peptide biot- $A\beta_{1-42}$ ) couplée à un second fluorophore, capable d'être excité à la longueur d'onde d'émission du premier fluorophore afin qu'il bénéficie d'un transfert de fluorescence si les deux fluorophores se trouvent à forte proximité.

- la mise en évidence des nouveaux composés inhibant l'interaction est détectée par fluorométrie à la longueur d'émission du premier fluorophore et/ou en mesurant la diminution du signal à la longueur d'onde d'émission du second fluorophore

Selon un mode particulier, ce second fluophore est la XL665 qui est l'allophycocyanine crosslinkée chimiquement pour augmenter sa fluorescence à 665 nm (CisBiointernational). La perte de l'interaction est donc est détectée par fluorométrie à la longueur d'onde d'émission du premier fluophore et par la  
5 diminution du signal de la XL665 dont la longueur d'onde d'émission est à 665 nm.

Ce procédé est tout à fait avantageux car il permet de mettre en évidence directement l'interaction entre les présénilines et l'APP et/ou le peptide A $\beta$  en phase liquide et homogène et par conséquent mettre en évidence les molécules  
10 inhibitrices de ladite interaction. En effet, ce procédé repose sur le transfert de fluorescence entre deux fluophores si ces deux chromophores sont en proximité physique (donc en cas d'interaction entre A $\beta$ <sub>1-42</sub> et la protéine recombinante). Selon une variante préférée du procédé, le premier fluophore est le cryptate d'Europium, porté par la protéine recombinante marquée (excité à 337 nm)  
15 réagissant avec la streptavidine-XL665 fixée sur le peptide biot-A $\beta$ , et en particulier le peptide biot-A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Avantagement, la protéine marquée est constituée par l'extrémité N-Terminale de l'une ou l'autre des présénilines (PSNT-K). La perte de la fluorescence à 665 nm et l'augmentation de la fluorescence à 620 nm caractéristique du cryptate d'Europium indique une inhibition de l'interaction  
20 entre les présénilines ou leurs extrémités N-Terminales et l'APP et/ou le peptide A $\beta$  par les molécules recherchées.

Selon une variante de ce procédé, la molécule ou le mélange contenant les différentes molécules peuvent être mis en contact d'abord avec l'extrémité N-terminale d'une préséniline purifiée marquée à l'aide du cryptate d'Europium  
25 (PSNT-K) puis avec le peptide A $\beta$ <sub>1-40</sub> ou A $\beta$ <sub>1-42</sub> portant une biotine et un bras de 3  $\beta$ Alanines (ou de 3 lysines) à leur extrémité N-terminale. Le mise en évidence de nouvelles molécules capables de moduler ou d'inhiber au moins en partie

l'interaction entre la préséniline 1 ou la préséniline 2 et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde sera faite également, après adjonction de la streptavidine marquée à la XL665, par spectrofluorométrie selon le procédé précédent et notamment par lecture de la fluorescence à 665 nm.

- 5            Selon un dernier mode de réalisation du procédé de mise en évidence de composés inhibant l'interaction d'une manière générale entre les présénilines (1 ou 2) et l'APP ou le peptide  $A\beta$  et d'une manière particulière entre la peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2 comporte les étape suivantes :

- 10           - on met en contact un mélange a) de lysats cellulaires contenant tout ou partie d'une préséniline (PS1 ou PS2) et avantageusement l'extrémité N-Terminale, b) de lysats cellulaires contenant l'APP, lysats obtenus à partir de cellules infectées par des virus et en particulier par des baculovirus et c) la molécule ou un mélange contenant différentes molécules à tester

- 15           - on co-immunoprécipite à l'aide d'anticorps appropriés et bien connus de l'homme du métier, les protéines solubilisées et correspondant aux présénilines ou à l'APP ou le peptide  $A\beta$

- la perte de la co-immunoprécipitation des présénilines et de l'APP est révélée par western blot avec des anticorps marqueurs indiquant que les molécules testées ont la propriété inhibitrice recherchée

- 20           Dans un mode particulier, les procédés de l'invention décrits précédemment sont adaptés à la mise en évidence et/ou l'isolement de ligands, agonistes ou antagonistes de l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.

La présente invention concerne également l'utilisation des polypeptides définis précédemment pour la mise en évidence de ligands des polypeptides mais surtout de ligands des présénilines, du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou du peptide  $\beta$ -amyloïde, et préférentiellement du peptide  $A\beta_{1-42}$  et/ou de l'extrémité N-Terminale de PS2, ainsi que de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon les procédés décrits ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs de par leur capacité à interférer au niveau de l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde peuvent donc moduler la production du peptide amyloïde  $A\beta_{1-42}$  et permettre de traiter certaines affections neurologiques et notamment la maladie d'Alzheimer.

Un autre objet de l'invention concerne la mise au point d'un test d'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde, et préférentiellement entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de transfert de fluorescence entre deux fluophores fixés aux molécules précédentes et une étape de révélation de l'interaction mesurée par spectrofluorométrie. Comme mentionné précédemment ce test est également utilisé pour la mise en évidence de molécules inhibitrices de la dite interaction, selon le procédé de détection de l'inhibition de l'interaction, décrit dans la présente demande.

L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe-actif au moins un polypeptide tel que défini ci-avant.

Elle a aussi pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou un fragment d'anticorps tel que défini ci-avant, et/ou un oligonucléotide antisens, et/ou un ligand tel que défini ci-avant. L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique  
5 comprenant comme principe actif au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-avant.

Par ailleurs, elle a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les peptides, anticorps, ligands et séquences nucléotidiques définis ci-avant sont associés entre-eux ou avec d'autres principes actifs.

Elle a également pour objet les compositions dans lesquelles les séquences  
10 nucléotidiques selon l'invention sont incorporées dans un vecteur recombinant viral ou non viral.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être utilisées pour inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde. Il s'agit plus préférentiellement  
15 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie d'Alzheimer.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation des polypeptides décrits auparavant pour inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde et de  
20 manière préférée l'utilisation de ces polypeptides pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer.

Pour leur utilisation selon la présente invention, les polypeptides de l'invention d'une part ou toute molécule capable d'inhiber au moins en partie  
25 l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde, les séquences nucléiques correspondantes d'autre part ou encore les vecteurs tels que décrits précédemment sont préférentiellement associés

à un ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour être formulés en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, ils sont utilisés sous une forme orale. La forme injectable peut être néanmoins  
5 envisagée et pourra en particulier être formulée avec des solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés  
10 injectables.

Les doses de vecteur et en particulier de virus utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du site d'administration considéré (organe, tissu nerveux ou musculaire), du nombre d'injections, du gène à exprimer, ou encore de la durée du  
15 traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15  
20 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre un moyen efficace pour traiter les maladies pour lesquelles l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde est impliquée et de manière préférée pour le  
25 traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer.

La présente invention sera plus amplement détaillée à l'aide des exemples ci- dessous considérés de manière descriptive et non limitative.

### Liste des figures

Figure 1 : A) Schéma des constructions PS2 tronquées

5 B) Expression en cellules COS1.

Figure 2 : Interaction des formes tronquées de PS2 avec APP.

Figure 3 : A) Interaction du N-term sécrété de PS2 (SecPS2NT) mais pas de sa forme cytoplasmique (myc-PS2NT) et de APP extracellulaire.

10 B) Mise en évidence de l'interaction SecPS2NT /APP mais pas de myc-PS2NT /APP en milieu extracellulaire.

Figure 4 : Interaction de PS2 avec les formes tronquées de APP :

A) Interaction de PS2 avec la forme SPA4CT de l'APP mais pas avec le domaine cytoplasmique de l'APP (MC45F).

B) Interaction de PS2 avec la forme C100 de l'APP

15 Figure 5 : Interaction de PS1 et PS1DC2 avec APP et sa forme courte:

A) Interaction de PS1 avec la forme entière de l'APP et la forme tronquée SPA4CT

B) Interaction de la forme tronquée de PS1 (PS1  $\Delta$ C2) avec l'APP

Figure 6 : Interaction de PS1 et de APP en cellules d'insectes.

20 A) Immunoprécipitats anti-Histidine (étiquette sur PS1), révélation APP

B) Immunoprécipitats anti-PS1, révélation APP

C) Immunoprécipitats inverse anti-APP, révélation PS1

Figure 7 : Interaction de la forme sécrétée de PS2NT avec le peptide A $\beta$  dans le milieu extracellulaire.

25 Figure 8 : Reconstitution de l'interaction A $\beta$ /PS2Nt in vitro sur filtre de nitrocellulose.



A) Dose-dépendance en fonction de la concentration de PS2Nt

B) Dose-dépendance en fonction de la concentration de A  $\beta$ .

Figure 9 : Interaction in vitro des formes complètes de PS1 et APP.

A) Immunoprécipitats anti-Histidine

5 B) Immunoprécipitats anti-PS1

Figure 10 : Déplacement par l'extrémité N-Terminale de PS2 précédée d'un peptide signal (SecPS2NT) de l'interaction entre PS1 et le fragment SPA4CT

Figure 11 : Interaction de PS2 NT avec le peptide A $\beta_{1-42}$  in vitro : mise en évidence par le test en plaque 96 puits (ELISA)

10 Figure 12 : Interaction de PS2 NT avec le peptide A $\beta_{1-42}$  mise en évidence par le test de transfert de fluorescence HTRF(homogenous Time-Resolved Fluorescence).

Figure 13 : Le blocage de l'interaction APP/PS1 avec SecPS2NT conduit à l'inhibition de la production de peptide amyloïde A  $\beta_{1-42}$  intracellulaire

15 A) Mise en évidence que le blocage de l'interaction APP/PS1 avec SecPS2NT conduit à l'inhibition de la production de peptide amyloïde A $\beta_{1-42}$  intracellulaire

B) Contrôle que l'expression de SecPS2NT n'a pas d'influence sur l'expression des différents transgènes

20 Figure 14 : Détection de l'interaction de PS2 avec l'APP endogène des cellules COS à l'aide du traitement pharmacologique à la lactacystine

Figure 15 : Interaction de PS2 et PS2 NT avec une deuxième région de l'APP, différente du peptide A  $\beta$ .

### **Matériels et méthodes**

#### **A/ MATERIELS**

### 1. Constructions exprimant les présénilines.

L'obtention de vecteur d'expression (vecteur hôte, pcDNA3, *InVitrogen*) en cellules mammifères des protéines humaines PS1 et PS2 a été décrite précédemment (Pradier et col., 1996). Plusieurs délétions successives par l'extrémité C-term de PS2 ont été générées (voir Fig1A). Les numérotations sont faites à partir du codon d'initiation de PS2 comme position 1.

Le fragment de restriction HindIII du vecteur PS2 (du 5' non-codant, position -55, au site interne à la position 1080) a été purifié et mis en ligation avec le vecteur pcDNA3 linéarisé par HindIII et traité à la phosphatase alcaline. La PS2 tronquée ainsi produite (PS2 $\Delta$ C1) s'étend de l'extrémité N-terminale au résidu 361 plus 7 résidus apportés par l'extrémité 3' et comprend donc les six premiers domaines transmembranaires et une large partie de la boucle hydrophile (Fig1A).

PS2 $\Delta$ C2 a été construit par digestion du plasmide PS2 par PstI (site interne à position 679) et ligation avec le fragment PstI correspondant à la partie 3' non-codante du vecteur PS2. La protéine tronquée PS2 $\Delta$ C2 s'étend de la position 1 au résidu 228 de PS2 plus 18 résidus supplémentaires apportés par l'extrémité 3'. Elle inclut les quatre premiers domaines transmembranaires de PS2.

Une construction similaire a été effectuée pour PS2 portant la mutation N141I, PS2  $\Delta$ C2\*.

Le fragment de restriction HindIII (-55)/MscI(590) de la construction PS2 $\Delta$ C2 a ensuite été cloné dans le vecteur pcDNA3 traité par HindIII et dont l'extrémité ApaI a été rendue à bout franc. Cette construction PS2 $\Delta$ C3 s'étend de l'extrémité N-term au résidu 198 plus 2

résidus supplémentaires comprenant donc les trois premiers domaines transmembranaires de PS2.

Le fragment de restriction de PS2 $\Delta$ C2, HindIII (-55)/NcoI(504) rendu à bout francs en son extrémité NcoI par traitement au fragment  
5 Klenow de l'ADN polymérase a été recloné dans le même vecteur pcDNA3 HindIII/(ApaI bout franc) pour construire PS2 $\Delta$ C4 s'étendant jusqu'au résidu 168 de PS2 plus 3 résidus supplémentaires.

La construction de l'extrémité N-terminale hydrophile de PS2 a été obtenue par amplification de la séquence PS2 avec les oligonucléotides  
10 ext5':

5'-CGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC-3' (SEQ ID4)  
(chevauchant l'ATG initial, en gras, et introduisant un site de restriction EcoRI, souligné) et ext3':

5'-CCGCTCGAGTCATTGTCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG-3'  
15 (SEQ ID5) (introduisant un codon stop après le résidu 90 de PS2 ainsi qu'un site de restriction XhoI, souligné).

Après clonage dans le vecteur pCRII par la méthode TA cloning (InVitrogen), la conformité du fragment de PCR a été vérifié par séquençage. Ce fragment (EcoRI/XhoI) a ensuite été introduit dans un  
20 vecteur pcDNA3 en phase avec une séquence correspondant à l'épitope myc à son extrémité N-terminale: mycPS2Nter.

Pour ne pas préjuger de la topologie de PS2, le même fragment Nter a été recloné dans le vecteur pSectagB, en phase avec la séquence du peptide signal de IgkB pour diriger la sécrétion de la protéine pS2Nter:  
25 SecPS2-Nter.

L'extrémité C-term de PS2 a été construite de façon similaire à l'aide du fragment de restriction HindIII (1080)/PstI(en 3'non-codant) recloné dans le vecteur pSecTagB HindIII/PstI, SecPS2Cter s'étendant du résidu 361 à l'extrémité C-terminale, ou dans le vecteur pcDNA3myc en phase avec l'épitope myc.

De même, une construction tronquée de PS1 a été obtenue. Le vecteur pcDNA3-PS1 a été digéré par PflmI (site à la position 636 de la séquence nucléique codante de PS1) et XhoI dans le 3'non codant de la séquence de PS1. Ces sites ont été transformés à bout franc par traitement à la T4 ADN polyméase. Le fragment vecteur, purifié sur gel d'agarose, a été relié sur lui-même pour fournir un vecteur d'expression d'une PS1 tronquée s'étendant du N-ter de PS1 jusqu'au résidu Ile213 (après le 5eme domaine transmembranaire) plus 12 résidus supplémentaires. Cette construction correspond à la chimère  $\Delta C2$  et est appelée PS1  $\Delta C2$ .

## 2.Constructions exprimant l'APP.

### 2.1 Constructions APP

Les différentes constructions APP complet (isoforme 695) et SPA4CT (les 100 derniers résidus de l'APP (acide aminé 597 à 695) précédés d'un peptide signal pour insertion à la membrane) ont été décrites précédemment (Dyrks et coll., 1993). Les vecteurs, pour l'expression de C100 et du domaine cytoplasmique de l'APP, ont été obtenus de la manière suivante : les cDNA correspondants ont été obtenus par amplification enzymatique de l'ADN (PCR (Polymerase Chain Reaction)) en utilisant, comme amorce de synthèse, les oligonucléotides suivants:

pour le C100 : les oligonucléotides 8172 et 8181; pour le domaine cytoplasmique de l'APP: les oligonucléotides 8171 et 8181.

**Oligo 8172** 5' CAAAGATCTGATGCAGAATTCCGACAT 3' (SEQ ID6)  
contenant:

- un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction BglII  
(souligné )

5 - la séquence codante pour les acides aminés 597-602 de l'APP  
(en gras) [numérotation APP de 695 acides aminés]

**Oligo 8181** 5' CAAGCGGCCGC TCATCCCTTGTCATCGTCGTCCT

TGTAGTCTCCGTTCTGCATCTGCTC 3' (SEQ ID7)

contenant :

10 - un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction NotI  
(souligné )

- la séquence complémentaire à la séquence codante pour les  
acides aminés 691-695 de l'APP (en gras) [numérotation APP de 695  
acides aminés]

15 - la séquence complémentaire à la séquence Asp-Tyr-Asp-Asp-  
Asp-Asp-Lys correspondant à l'épitope FLAG (en italique ).

**Oligo 8171** 5'CAAAGATCTAAGAAACAGTACACATCC 3' (SEQ ID8),  
contenant:

- un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction BglII  
(souligné )

20 - la séquence codante pour les acides aminés 650-655 de l'APP  
(en gras) [numérotation APP de 695 acides aminés]

Les produits de l'amplification enzymatique de l'ADN ont été clonés dans le vecteur pCRII. La séquence nucléotidique a été vérifiée par la méthode des terminateurs spécifiques d'ADN.

5 Les cDNA sont ensuite introduits par ligation dans le plasmide d'expression dérivé du plasmide pSV2 et contenant, dans le même cadre de lecture, un épitope MYC.

2.2. Construction des formes solubles de l'APP:  $\alpha$ -sAPP et  $\beta$ -sAPP.

Les ADNc correspondants aux formes sécrétées de l'APP se terminant aux sites  $\alpha$ - et  $\beta$ - de clivage ont été obtenus par PCR.

10 L'oligonucléotide 1:

5'-ccatcgatggctaCATCTTCACTTCAGAG-3' (SEQ ID 9) introduit:

- un codon stop (séquence complémentaire inverse soulignée) après la position 1788 de l'APP correspondant au site de clivage  $\beta$ .

-et un site de restriction ClaI.

15 L'oligonucléotide 2:

5'- ccatcgatggctaTTTTTGATGATGAACTTC -3' (SEQ ID 10) introduit:

- un codon stop (séquence complémentaire inverse soulignée) après la position 1836 de l'APP correspondant au site de clivage  $\alpha$ .

-et un site de restriction ClaI.

20 L'oligonucléotide 3:

5'- CCGTGGAGCTCCTCCCG -3' (SEQ ID 11), commun pour les deux formes, correspond à la région 1583 à 1600 de l'APP incluant le site de restriction interne de l'APP SacI (souligné).

5 L'ADNc de l'APP a été amplifié par PCR en utilisant les paires  
oligo3-oligo1 et oligo3-oligo2 pour  $\beta$ -sAPP et  $\alpha$ -sAPP respectivement.  
Les produits d'amplifications ont été sous-clonés comme précédemment  
en pCRII et les séquences vérifiées par séquençage. Pour chacun, le  
fragment de restriction SacI-ClaI ont été purifiés et reclés dans le  
vecteur d'expression APP (voir ci-dessus) digéré lui-aussi par SacI-ClaI  
10 pour remplacer la partie C-terminale de l'APP par les fragments C-  
terminaux de  $\beta$ -sAPP et  $\alpha$ -sAPP respectivement et reconstituer les  
protéines complètes.

### 3. Constructions baculovirus.

15 L'obtention de vecteur de transfert pour baculovirus codant pour  
la protéine humaine PS1 a été réalisé à partir de vecteur d'expression pour  
cellules de mammifères (Pradier et col, 1996). L'ADNc codant pour la  
protéine PS1 a été extrait par une digestion par les enzymes de restriction  
XhoI et NotI, puis cloné dans le plasmide de transfert pAcHTLB (protéine  
de fusion 6Histidines) et pAcSG2 ( protéine native). L'obtention de  
20 baculovirus recombinants s'effectue selon le protocole du fournisseur  
(Pharmingen) et consiste à cotransfecter  $2 \times 10^6$  cellules d'insectes (sf9)  
avec 1  $\mu$ g de plasmide de transfert contenant le gène d'intérêt et 0.5  $\mu$ g  
d'ADN viral (Baculogold). Après 5 jours à 27°C, les cellules sont grattées,  
puis centrifugées, le surnageant est utilisé comme stock viral pour  
25 l'amplification et la détermination du titre viral, l'expression de la protéine  
est visualisée par western blot sur le culot cellulaire.

L'obtention du baculovirus exprimant l'APP Humain (695) a été  
décrite précédemment (Essalmani et col, 1996).

Pour l'étude de l'expression de PS1 et d'APP, les cellules sf9 sont coinfectées à une M.O.I de 2 par des baculovirus exprimant l'APP humain (695), la protéine humaine Présiniline 1 (PS1), ou PS1 avec un tag 6 histidine en N terminal (6HisPS1), ou la protéine de contrôle de pseudomas putrida XylE avec un tag 6 histidine en N terminal (6HisXylE), puis solubilisées par un tampon Tris 10mM, NaCl 130mM, Triton X100 1%, NP 40 1%, pH 7.5.

Les protéines solubilisées sont immunoprécipitées par un anticorps antiHistidine (A), antiPS1 (1805)(B), ou antiAPP (22C11) (C). La présence de l'APP ou de PS1 a été révélée par western blot avec l'anticorps antiAPP aCT43(A), 22C11(B), ou l'anticorps antiPS1 95/23(C).

Les fractions solubilisées contenant l'APP, PS1 ou 6HisPS1 sont mélangées, puis immunoprécipitées en présence d'anticorps anti Histidines ou antiPS1 pendant une nuit à 4°C. La coimmunoprécipitation de l'APP est révélée après western blot avec les anticorps  $\alpha$ CT43 ou 22C11.

#### 4. Les plasmides

Les plasmides utilisés pour l'invention sont les suivants:

- pcDNA est un plasmide commercial (InVitrogen) utilisé pour le clonage et l'expression en cellules mammifères des séquences PS1 et PS2 et de leur formes tronquées.

- pCRII est un plasmide commercial (InVitrogen), utilisé pour le clonage de fragments de PCR

- pSecTagB est un plasmide commercial (InVitrogen), utilisé pour le clonage et l'expression en cellules mammifères d'ADNc auxquels sont rajoutés le signal de sécrétion (peptide signal Ig  $\kappa$ ).



- pSV2 est un plasmide commercial (Pharmacia), utilisé pour le clonage et l'expression en cellules mammifères d'ADNc.

- pAcHTLB est un plasmide commercial (Pharmlngen), pour l'insertion d'un épitope (His)6 à des ADNc et la recombinaison homologe avec des baculovirus.

- pAcSG2 est un plasmide commercial (Pharmlngen), pour la recombinaison homologe avec des baculovirus.

- pET29a est un plasmide commercial (Novagene), pour l'expression d'ADNc en bactéries.

## **B/ METHODES**

### **1. Transfection de cellules**

La méthode établie pour les cellules COS1 ou les cellules CHO, consiste à utiliser un lipofectant dans un ratio de 1 pour 8 (poids/poids) par rapport à l'ADN et un peptide synthétique H1 (séquence: KTPKKAKKPKTPKKAKKP) au même ratio afin d'optimiser la compaction de l'ADN et l'efficacité de transfection. Cette méthode repose notamment sur la neutralisation des charges des phosphates de l'ADN par les charges positives du lipofectant.

Les cellules COS1 sont cultivées en incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5 % de CO<sub>2</sub> dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 4.5 g/l glucose (Gibco-BRL) supplémenté avec 3 % de L-Glutamine, 1% de pénicilline-streptomycine et 10 % de Sérum de Veau Foetal.

La veille de la transfection, les cellules sontensemencées à une densité de  $2.5 \cdot 10^6$  cellules par boîte de 100 mm. Le jour de la transfection les cellules sont rincées 2 fois par du PBS (Phosphate Buffer Saline) et une fois en OptiMEM (composition brevetée; Gibco-BRL) pour une  
5 habitude d'au moins 15 minutes en incubateur.

Par équivalent-boîte de 100 mm, 8  $\mu$ g d'ADN plasmidique au total sont ajoutés à 300  $\mu$ l d'OptiMEM et 64  $\mu$ g de peptide H1. Après avoir vortexé vigoureusement pendant 10 secondes, on attend 5 minutes et la lipofectamine (32  $\mu$ l, soit 64  $\mu$ g) diluée dans 300  $\mu$ l d'OptiMEM est  
10 ajoutée au mélange précédent. L'ensemble est une nouvelle fois vortexé vigoureusement puis laissé 30 minutes reposer. Cinq millilitres d'OptiMEM sont ajoutés par tube et le mélange vortexé est placé sur les cellules (dont le milieu a été au préalable aspiré). Les cellules sont alors placées en incubateur pendant 4 heures, au terme desquelles le mélange  
15 est remplacé par du milieu complet.

## **2. Lyse des cellules et dosage des protéines**

Les cellules sont le plus souvent lysées 48 heures après la transfection (au maximum habituel d'expression). Le tampon de lyse contient 10 mM de Tris pH 7.5, 1 mM d'EDTA, 1 % de Triton X100, 1 %  
20 de NP40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete®, Boehringer-Mannheim). Pour chaque plaque, après un rinçage au PBS, 800  $\mu$ l du tampon froid sont ajoutés. Les lysats subissent alors une sonication suivie d'une agitation au barreau magnétique à 4°C pendant une nuit. Une centrifugation de 30 minutes à 15000 tr/mn sépare le culot du  
25 surnageant. Les protéines solubles sont alors dosées selon le kit BCA (Pierce) afin de pouvoir normaliser les expériences suivantes.

## **3. Immunoprécipitations**

Les anticorps dirigés contre le peptide du N-term de PS2, 95041, (Blanchard et coll., 1997) et contre les vingt premiers acides aminés de PS1 (Duff et coll., 1996) ont été obtenus chez le lapin par immunisation avec des peptides synthétiques. Pour l'immuno-précipitation, 100 µg de protéines sont dilués dans 400 µl de RIPA modifié (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1 % Triton X100 v/v, 1% NP40 v/v). Trente microlitres de suspension de protéine A Sépharose (0.1 % m/v en solution de PBS) et 3 µl d'anticorps sont ajoutés. Les suspensions sont mélangées doucement sur un agitateur rotatif à 4°C pendant une nuit. Le complexe de protéine A Sépharose est lavé 3 fois avec 0.5 ml de RIPA modifié et une fois avec 0.5 ml de tampon de lavage « Wash C » (10 mM Tris pH 7.5).

#### **4.Immunotransfert**

Les échantillons (lysats de cellules) sont dénaturés dans un volume égal de tampon de dépôt (125 mM Tris pH 6.8, 4% m/v SDS, 20 % glycérol, 0.02 % Bromophénol Blue, 50 mM Dithiothreitol) à 95°C pendant 5 minutes. Pour l'analyse de l'expression des présénilines, les échantillons sont dénaturés en présence de 8 M urée et à 37 °C afin d'éviter l'agrégation propre aux présénilines à 95 °C.

Les échantillons sont déposés sur des gels Tris-Glycine (Novex), avec un pourcentage d'acrylamide différent selon le poids moléculaire à discriminer. Un marqueur de Poids Moléculaire est également déposé (Broad Range, BioRad). La migration a lieu pendant environ 2 heures à 100 Volts constants dans du tampon SDS 1X final (Novex). Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (Tampon de transfert 1X final (Novex) avec 10 % de méthanol) pendant 2 heures à 150 mA constants.

Après transfert, la membrane est bloquée pendant 2 heures à température ambiante dans 50 ml de PBS-T (PBS avec 0.5 % Tween)

contenant 2 % de lait écrémé (Merck). L'anticorps primaire (dilué à la concentration optimale de l'ordre du 1/1000e au 1/5000e, dans du PBS-T avec ou sans 2 % de lait écrémé) est laissé sur une nuit à 4 °C. Après un bref rinçage en PBS-T, la membrane est incubée 45 minutes en présence  
5 du deuxième anticorps (IgG anti-souris ou anti-lapin selon le cas, couplé à la peroxydase de Raifort) dilué au 1/5000<sup>e</sup> dans un tampon dit « ECL » (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 0.1 %).

La membrane est alors rincée 4 fois 15 minutes dans le tampon «ECL». Elle peut être révélée par le réactif ECL (Amersham) constitué de  
10 2 tampons à mélanger extemporanément en volume égal. Différentes expositions d'un film photographique (Hyperfilm ECL ; Amersham) sont effectuées, suivies d'un développement.

### **5. Fixation in vitro de PS2 NT avec le peptide A $\beta$ Amyloïd**

#### **5.1 Production de la protéine recombinante PS2 NT en bactérie**

15 Pour la création d'un vecteur d'expression bactérien de PS2NT (amino acides 1 à 87), l'ADNc de PS2 a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides  
3':(CCGCTCGAGTCATTGTCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG)  
et 5' (CCGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC). Le  
20 fragment résultant a été cloné dans pCRII et la séquence confirmée. Ce fragment a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pET29a (Novagene) en phase avec la séquence de l'étiquette S-tag. La protéine a été produite en bactérie BL21 Après induction à l'IPTG pour 5h, les bactéries ont été récupérées par centrifugation (10 min à 6000tours/mn) et le culot cellulaire  
25 dissout en tampon RIPA (volume calculé en multipliant la DO de la culture, après induction par le volume de culture divisé par 23). Les bactéries ont été lysées par sonication et le lysat centrifugé à 13000 tr/min pendant 20 min à 4°C. Le surnageant (extrait total) a été utilisé pour les études de fixation.

La protéine recombinante PS2NT a aussi été purifiée de l'extrait total sur colonne de Nickel (étiquette poly-His apportée dans le vecteur pET29a) comme décrit par le fournisseur (Novagene).

#### 5.2 Test de fixation PS2NT/A $\beta$ 42 sur membrane de nitrocellulose

5 Le peptide A $\beta$  synthétique (en solution) a été déposé sur membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell) en utilisant un appareil dot-blot 96 puits. Après dépôt, le filtre a été bloqué (envers les sites non-spécifiques de fixation de protéines) avec le réactif de bloc  
10 gélatine (Novagen) dilué au 10<sup>ème</sup> en TBST. Après blocage, le filtre a été remplacé sur l'appareil de dot-blot et l'extrait bactérien PS2NT ajouté dans les puits pour une incubation de 2h à température ambiante. Comme  
15 contrôle, un extrait bactérien contenant le plasmide vide pET29 a été utilisé sur des puits en duplicat. Le filtre a ensuite été lavé une fois avec du tampon RIPA, puis retiré de l'appareil et lavé trois fois avec du PBST (15min pour chaque lavage). La détection de l'étiquette S-tag a ensuite été effectuée comme prescrit par le fournisseur (Novagen) avec un substrat colorimétrique. La quantification de la réaction colorimétrique (précipitat) a été effectuée par scanning optique du filtre et quantification de l'intensité dans chaque puit par le logiciel Tina 2.1 (Raytest).

#### 20 5.3 Test d'interaction PS2NT/A $\beta$ 42 en format ELISA

Le peptide A $\beta$  (1-40 et 1-42) synthétique (100 $\mu$ l, 2 $\mu$ g/ml) est incubé sur la nuit en plaques 96 puits pour fixation sur le plastique. Les plaques sont rincées deux fois avec du PBS et les sites de fixation non-spécifiques sont saturés par incubation avec 5% (p/v) d'Albumine de Serum de Boeuf  
25 en PBS. La protéine recombinante purifiée (selon le protocole décrit en 5.1), PS2NT, diluée en tampon (25mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40) est ajoutée et incubée pendant 4h, à température ambiante. Après deux rinçages en PBS-Tween 0.5%, la protéine PS2NT retenue sur la

plaque (en interaction avec le peptide A $\beta$ ) est révélée par incubation avec la protéine fixatrice du S-Tag couplée à l'alkaline phosphatase comme précédemment. La détection du signal est effectuée dans un spectrophotomètre à 450 nm.

5

#### 5.4 Test d'interaction PS2NT/A $\beta$ 1-42 en format HTRF (Homogeneous Time-Resolved Fluorescence).

La protéine purifiée PS2NT (produite selon le protocole décrit en 5.1) a été marquée à l'aide du fluorophore cryptate d'Europium (PS2NT-K).  
10 Les peptides A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub> ont été synthétisés avec une biotine et un bras écarteur de 3  $\beta$ Alanines (ou de 3 lysines) à leur extrémité N-terminale (en amont de la position 1 des peptides A $\beta$ ) et deux Arginines (R) en leur extrémité C-terminale pour faciliter la synthèse, peptides biot-3K-A $\beta$ 40<sub>RR</sub> et biot-3K-A $\beta$ 42<sub>RR</sub>.

15 La réaction d'interaction de PS2NT-K avec biot-A $\beta$ 40 ou biot-A $\beta$ 42 est effectuée dans un tampon 10mM HEPES, pH=7.2, contenant 150mM NaCl, 3.4 mM EDTA et 3 mM CHAPS (détergent). La protéine PS2NT marquée (conc. finale 6nM, soit 40  $\mu$ l de solution initiale à 15nM) est incubée avec le peptide biot-A $\beta$ 40 ou biot-A $\beta$ 42 (conc. finale 2  $\mu$ M, soit 40  
20  $\mu$ l de solution initiale à 5  $\mu$ M et 20  $\mu$ L de tampon) pendant 10 min. suivi par l'addition de streptavidine marquée à la XL665 (XL665 est une allophycocyanine crosslinkée, CisBio International) à la concentration de 8 $\mu$ g/ml (soit 100 $\mu$ l de solution initiale à 16  $\mu$ g/ml) dans un tampon HEPES 100mM pH=7.0 contenant 400mM KF, 133mM EDTA et 1g/l BSA. La  
25 réaction est incubée, soit 4h à température ambiante, soit 24 h à 4°C et les plaques sont lues sur un compteur Packard Discovery qui mesure d'une part l'émission du cryptate d'Europium à 620nm après excitation à 337nm et

d'autre part l'émission de la XL665 à 665nm après transfert de la fluorescence à 620nm par le cryptate d'Europium sur la XL665. La formation du complexe XL665-streptavidine/biot-A $\beta$ 42/ PS2NT-cryptate conduit à un transfert de fluorescence du cryptate vers la XL665 qui est mesuré à 665 nm par le compteur. En l'absence de formation d'un complexe XL665-streptavidine/biot-A $\beta$ 42/ PS2NT-cryptate, le cryptate d'Europium fluoresce à 620nm.

## EXEMPLES

### Exemple 1. Interaction entre APP et PS2 et cartographie de la zone d'interaction sur PS2.

Cet exemple a pour but de déterminer la zone d'interaction sur PS2 et de mettre en évidence une interaction entre ladite région et l'APP.

L'interaction entre les protéines APP et PS2 en cellules mammifères est exemplifiée dans la figure 2. Le lysat de cellules COS transfectées avec PS2 et APP est soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre le N-term de PS2 ( 95041, Blanchard et col., 1997). L'immunoprecipitat est ensuite analysé par immunotransfert avec un anticorps contre l'APP. L'APP est clairement détecté dans les immunoprécipitats des cellules cotransfectées avec APP et PS2 mais pas en l'absence de PS2 (Fig2., piste 6 par rapport à piste 7) comme précédemment décrit (Weidemann et col., 1997). Pour cartographier la zone d'interaction entre ces deux protéines, plusieurs formes tronquées de PS2 ont été construites. Afin de conserver la topologie membranaire de PS2 déterminée en général par la partie N-term des protéines membranaires, des tronquations progressives de l'extrémité C-term de PS2 ont été produites se terminant après différents domaines

transmembranaires TM6 (PS2 $\Delta$ C1), TM4 (PS2 $\Delta$ C2), TM3 (PS2 $\Delta$ C3) et TM2 (PS2 $\Delta$ C4), schéma Fig1A. L'extrémité N-term hydrophile (87 résidus) de PS2 a aussi été construite sous forme cytoplasmique (séquence native) ou sous forme sécrétée par l'insertion du peptide signal de la chaîne Igk. L'expression de ces différentes formes est exemplifiée figure 1B, révélée à l'aide de l'anticorps anti-PS2 (95041). Les constructions possédant des domaines hydrophobes présentent en plus des bandes correspondant aux formes monomériques au poids moléculaires attendus (formant ici des doublets rapprochés), des formes dimériques et des agrégats de haut poids moléculaires typiques de PS2 (Fig1B, pistes 3-5). En particulier pour PS2 complète, seuls ces agrégats sont détectables dans cette figure tandis que la forme monomérique n'est pas détectable (piste 6). Les deux constructions du N-term hydrophile de PS2: mycPS2Nt et SecPS2Nt donnent lieu aux bandes aux poids moléculaires attendus ( Fig1B, pistes 1 et 2.). La construction SecPS2Nt est également sécrétée dans le milieu extracellulaire (Fig 3B, piste 2) tandis que la construction mycPS2Nt est, elle, cytoplasmique.

Ces constructions ont été cotransfectées individuellement avec l'APP. La fraction détergent-soluble des lysats cellulaires a été immunoprécipitée avec l'anticorps dirigé contre le N-term de PS2 et ces immunoprécipitats analysés par immunoblots. Comme avec la PS2 complète, l'APP est détectable dans les immunoprécipitats avec toutes les formes tronquées de PS2, PS2 $\Delta$ C2 à PS2 $\Delta$ C4 (Fig2, pistes 3-5) démontrant l'interaction entre APP et les formes contenant le N-term de PS2. Cette interaction avec l'APP est conservée avec la construction N-term de PS2 sous sa forme sécrétée (Fig2, piste 2) démontrant que l'ancrage de PS2Nt dans la membrane lipidique n'est pas nécessaire pour cette interaction. Par opposition, la forme cytoplasmique mycPS2NT n'interagit pas avec APP (Fig2,piste 1).



L'expérience inverse d'immunoprécipitation par un anticorps anti-APP et de la détection par l'anticorps N-term de PS2 a permis de confirmer l'interaction entre l'APP et SecPS2Nt dans des conditions expérimentales différentes .

5 Dans le milieu de culture des cellules cotransfectées avec APP et SecPS2Nt, une interaction entre ces deux protéine est également démontrée par coimmunoprécipitation (Fig3A, piste4 et Fig3B, piste3). La forme mycPS2NT n'interagit pas avec APP dans le milieu (Fig3B, piste2). La présence de cette interaction dans le milieu, démontre que le complexe APP/PS2Nt est relativement stable au cours du processus de sécrétion.

10

**Exemple 2. Interaction entre APP et PS2 et cartographie de la zone d'interaction sur APP.**

Cet exemple a pour but de déterminer la zone d'interaction en ce sur l'APP et de mettre en évidence une interaction entre ladite région et la préséniline 2.

15

A cet effet, des formes tronquées de l'APP ont été utilisées pour délimiter la zone d'interaction sur l'APP. Une construction comportant les 100 derniers résidus de l'APP sous le contrôle ou non d'un peptide de sécrétion (SPA4CT et C100, Dyrks et col.,1993) et une construction comportant seulement le domaine cytoplasmique (les 45 derniers résidus de l'APP) ont été utilisées et leur présence détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre le domaine cytoplasmique de l'APP ( $\alpha$ CT43, Stephens et Austen, 1996). Dans les cellules cotransfectées avec PS2, une interaction de SPA4CT mais pas du domaine cytoplasmique de l'APP avec PS2 a pu être mis en évidence (Fig 4A, comparer pistes 4 et 5). L'interaction de PS2 avec la construction C100 (sans signal de sécrétion) a aussi pu être démontrée (Fig4B, piste 7). Même en associant le domaine cytoplasmique de l'APP à la membrane dans une construction chimérique avec le

20

25

récepteur alpha de l'IL2, aucune interaction avec PS2 n'a pu être observée. Cet exemple démontre qu'il existe une interaction avec SPA4CT (résidus 597 à 695 de l'APP) mais pas avec le domaine cytoplasmique (résidus 651 à 695) indiquant donc que sur l'APP, la région du A $\beta$  (résidus 597 à 637) et le reste du segment transmembranaire (jusqu'au résidu 650) sont suffisantes pour l'interaction avec PS2.

### **Exemple 3. Interaction de PS1 avec APP et cartographie initiale.**

Cet exemple a pour but de déterminer la zone d'interaction sur PS1 et de valider l'interaction entre ladite région et l'APP.

Par analogie aux résultats obtenus pour PS2 (exemples 1 et 2), l'étude de l'interaction de PS1 avec APP a été réalisée dans le même système cellulaire COS1. Après coimmunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre les 20 derniers acides aminés de PS1 (Duff et col., 1996), le SPA4CT, le fragment C-terminal de l'APP, a pu être détecté dans les précipitats (Fig. 5A, piste4). L'APP aussi interagit avec PS1. De même, la forme tronquée de PS1, PS1 $\Delta$ C2(1-213), interagit avec APP (Fig5B. piste4). Ces premières données nous permettent d'envisager que les régions d'interaction entre APP et PS1 doivent être voisines de celles exemplifiées précédemment avec PS2.

Pour vérifier la validité et la généralité de cette interaction PS1/APP, un système cellulaire différent a été utilisé, dans lequel les cellules d'insectes ont été infectées par des baculovirus recombinants exprimant la PS1 avec ou sans étiquette His6 et l'APP (c.f. Matériels et méthodes). L'étude des lysats cellulaires a permis de détecter l'APP dans les immunoprécipitats antiHis6 (pour la PS1-His6, Fig6A, piste4) ou antiPS1 (pour la PS1 avec ou sans His6, Fig6B, pistes 4 et 5) lorsque les cellules sont coinfectedes avec les deux types de virus recombinants mais pas lorsqu'une seule des protéines est exprimée (pistes 1,2 et 3

correspondantes). Inversement, dans les immunoprécipitats anti-APP, les protéines PS1-His6 et PS1 sont détectables (Fig6C, pistes 4 et 5) pour les doubles infections. Cette expérience permet de confirmer l'interaction dans le sens inverse avec des anticorps différents.

5        **Exemple 4. Interaction de A $\beta$  et PS2 en cellules**

Etant donné que la région d'interaction entre l'APP et la PS2 implique sur l'APP, une région incluant le peptide amyloïde (de 595 à 635) et sur la PS2, son domaine N-term hydrophile, il est démontré dans cet exemple que cette dernière interagissait directement avec le peptide amyloïde (A $\beta$ ) produit par des cellules. L'expression de SPA4CT (correspondant aux 100 derniers résidus de l'APP précédés d'un peptide signal) en cellules COS conduit à une forte production du peptide amyloïde, en partie car SPA4CT est considéré comme le précurseur biologique du A $\beta$ . Les cellules COS ont été transfectées avec SPA4CT seul, SPA4CT et SecPS2Nt ou avec SecPS2Nt seul. Les milieux extracellulaires correspondant ont été immunoprécipités avec l'anticorps antiPS2 et le peptide A $\beta$  a été détecté grâce à l'anticorps spécifique W02 (Nida et al. (1996) J. Biol. Chem.271, 22908-914)(Fig7). Le peptide A $\beta$  est identifié seulement pour les cellules cotransfectées avec SecPS2Nt et SPA4CT comme une bande de faible intensité (Fig7, piste 1) mais pas avec les contrôles individuels (Pistes 2 et 3). Par ailleurs, une bande supplémentaire à approximativement 40 kDa est aussi détectée de façon spécifique pour les cellules doublement transfectées. Après lavage du filtre et détection avec l'anticorps PS2, il apparaît qu'une bande au même poids moléculaire est également PS2-immunoréactive (Fig7, piste 4). Cette bande est aussi présente pour les cellules transfectées avec SecPS2Nt comme attendu. Ainsi, dans les cellules doublement transfectées, cette bande représente un complexe SDS-stable entre SecPS2Nt et le A $\beta$ , pouvant confirmer l'interaction entre ces deux entités. La faible différence

de masse apportée par le peptide A $\beta$  (4kDa) expliquerait qu'il n'y ait pas de différence de taille détectable avec les cellules transfectées avec SecPS2Nt seulement. Les résultats de ces expériences permettent de conclure que la forme sécrétée de PS2 (secPS2Nt) interagit in vitro avec le peptide A $\beta$  (résidus 597-637 de l'APP695).

**Exemple 5. Reconstitution de l'interaction de A $\beta$  et PS2Nt en test in vitro sur membranes de nitrocellulose.**

Cet exemple a pour but de démontrer la reconstitution de l'interaction PS2Nt-APP(A $\beta$ ) in vitro.

Pour confirmer l'interaction entre le peptide A $\beta$  et PS2Nt (extrémité N-terminale de PS2), un test de fixation in vitro a été développé. Une protéine de fusion PS2Nt portant le peptide étiquette/marqueur S (S-tag) à son extrémité N-terminale a été construite et exprimée en bactérie. Les peptides A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$  ont été déposés sur membranes de nitrocellulose qui ont été incubées en présence d'un extrait bactérien exprimant la protéine PS2Nt. Le S-tag a ensuite été révélé par la protéine fixatrice du S-tag couplé à l'alkaline phosphatase et par réaction colorimétrique. La protéine S-tag-PS2Nt se fixe bien sur les peptides A $\beta$  dans ce test in vitro (Fig8A). Comme contrôles, des duplicats ont été incubés en présence d'un extrait bactérien n'exprimant que le peptide S qui est utilisé comme niveau de fixation non-spécifique sur le peptide A $\beta$  (formes 1-40 et 1-42). Des dilutions sérielles de l'extrait bactérien permettent d'établir que cette fixation est dose-dépendante et saturable. Dans cette expérience, la fixation semble être plus importante sur le A $\beta_{1-42}$  que sur le A $\beta_{1-40}$  avec cependant une certaine variabilité. Par exemple, la fixation de PS2Nt est dépendante de la dose de A $\beta$  déposée sur la

membrane, alors que  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$  présentent des valeurs équivalentes de fixation.

Cet exemple fourni donc une démonstration de la reconstitution de l'interaction PS2Nt-APP( $A\beta$ ) in vitro entre  $A\beta$  synthétique et la PS2NT d'origine bactérienne. Etant donné que les mutations pathologiques de PS2 conduisent à une augmentation du ratio  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  produit dans de nombreux systèmes et que par ailleurs, il y a interaction physique entre PS2 et APP, il apparaît que cette interaction physique pourrait être impliquée dans la production du peptide  $A\beta_{1-42}$ . Ainsi, l'inhibition de cette interaction constitue une approche thérapeutique extrêmement originale pour la maladie d'Alzheimer.

Exemple 6. Test d'interaction  $A\beta_{42}$ /PS2NT en format 96 puits (type ELISA). Fig 11

L'exemple 5, fournit des résultats démontrant l'interaction directe entre le peptide  $A\beta$  et la protéine PS2NT sur membrane de nitrocellulose. Cet exemple a pour but de confirmer les informations de l'exemple 5 et de décrire la mise en évidence de l'interaction dans un format de plaques 96 puits. Le peptide  $A\beta$  ( $A\beta_{40}$  ou  $A\beta_{42}$ ) est fixé par incubation sur plaques 96 puits plastique. Les plaques sont ensuite incubées avec la protéine PS2NT recombinante. Après rinçages, la détection de l'interaction ( $A\beta$ /PS2NT) se fait par fixation de la protéine fixatrice du S-tag dans les puits et révélation colorimétrique. PS2NT se fixe de façon dose-dépendante sur le peptide  $A\beta_{1-42}$  (Fig 11) mais pas sur le peptide  $A\beta_{1-40}$  ou sur le peptide de séquence inversée  $A\beta_{40-1}$ , ni sur un autre peptide amyloïdogène, l'amyline. Les quantités de peptides  $A\beta_{1-42}$  ou  $A\beta_{1-40}$  fixées sur les plaques sont identiques comme vérifié par immunodétection). La constante de fixation de PS2NT sur  $A\beta_{42}$  est de 0.18  $\mu$ M. La spécificité de PS2NT

pour la forme A $\beta$ 42 du peptide par rapport à A $\beta$ 40 n'avait été que suggérée dans l'exemple 5. Cet exemple établit cette spécificité qui est parfaitement reproductible dans le présent test.

5 Ce format de test d'interaction A $\beta$ 42/PS2NT permet donc d'envisager facilement un test de criblage de molécules qui inhibent cette interaction.

Exemple 7. Test d'interaction A  $\beta$ 42/PS2NT en format HTRF

10 Dans les exemples 5 et 6, l'interaction directe entre le peptide A $\beta$ 42 et la protéine PS2NT a été démontrée d'une part sur membrane de nitrocellulose et d'autre part sur plaques 96 puits (type ELISA).

Cet exemple a pour but de confirmer ces informations et décrit la mise en évidence de l'interaction en phase liquide/homogène en utilisant la technique de transfert de fluorescence.

15 Le principe du test décrit dans Matériels et Méthodes (5.4) repose sur le transfert de fluorescence. La protéine recombinante PS2NT marquée au cryptate d'Europium (PS2NT-K) interagit avec le peptide biot-A $\beta$ 42 comme le montre la figure 12 (barre N°3). Ce signal est diminué et donc l'interaction PS2NT-K/biot-A $\beta$ 42 est déplacée par un excès de PS2NT non marquée (CI50=400nM). Le signal de fluorescence détecté est stable dans le temps :  
20 de 4h à température ambiante à 24 h à 4°C (selon les conditions choisies, décrites dans Matériels et Méthodes).

25 Cette interaction est dose-dépendante pour le peptide biot-A $\beta$ 42 (zone de linéarité du signal de 0 à 2.5 $\mu$ M) et pour PS2NT-K (zone de linéarité du signal de 0 à 7.5 nM). Comme l'indique la figure 12, barre N° 5, il n'y a pas d'interaction de PS2NT-K avec le peptide biot-A $\beta$ 40 apportant un élément supplémentaire de spécificité. La spécificité de PS2NT pour la

forme A $\beta$ 42 du peptide par rapport à A $\beta$ 40 qui n'avait été que suggérée dans l'exemple 5 est donc confirmée dans l'exemple 6 et le présent exemple.

5 Ce test HTRF d'interaction entre PS2NT et A $\beta$ 42 (reflétant l'interaction APP/PS en cellules) permet donc l'identification de molécules chimiques inhibant cette interaction par un criblage à haut flux.

#### **Exemple 8. Reconstitution de l'interaction APP/PS1 in vitro**

10 Cet exemple a pour but de démontrer que l'interaction entre les protéines complètes APP et PS1 peut être recréée à partir de lysats cellulaires différents, mélangés uniquement pour mettre en évidence l'interaction.

15 Le système d'expression baculovirus permettant l'expression de grandes quantités de protéines recombinantes, les lysats de cellules infectées individuellement par chacun des trois virus ont été utilisés comme source de protéines APP, PS1 et PS1-His6. Les fractions solubilisées contenant l'APP, PS1 ou 6HisPS1 sont mélangées, puis immunoprécipitées en présence d'anticorps anti Histidines ou antiPS1 pendant une nuit à 4°C. L'APP est clairement détecté dans les  
20 immunoprécipitats (Fig 9A, piste3 et Fig9B, piste 3) démontrant que l'interaction APP avec PS1-His ou PS1 est reconstituée in vitro par incubation des deux protéines. L'APP seul semble être faiblement précipité par l'anticorps anti-PS1 (Fig9B, piste1) mais pas avec l'anticorps anti-His confirmant la spécificité de l'interaction dans ce cas-là. Ces  
25 résultats permettent la mise au point d'un test d'interaction in-vitro des deux protéines complètes APP et PS1.

**Exemple 9. SecPS2Nt bloque l'interaction de APP et PS1 en cellules transfectées.**

Il a été démontré dans les exemples précédents que APP interagit avec PS1 de façon semblable à PS2 et que pour cette dernière, la construction SecPS2Nt suffit à l'interaction avec APP. Cet exemple a pour but d'évaluer si la fixation de SecPS2Nt sur l'APP peut bloquer l'interaction avec PS1 de façon croisée (hétérologue). Dans le système COS1, le SPA4CT (correspondant aux 100 derniers résidus de l'APP précédés d'un peptide signal) peut être détecté dans les immunoprécipitats anti-PS1 des cellules exprimant SPA4CT et PS1wt ou PS1 mutant, PS1\*.(Fig10A, pistes 1 et 2). En outre, lorsque SecPS2NT est également cotransfecté, le signal SPA4CT disparaît quasiment dans les immunoprécipitats anti-PS1 (Fig 10A, pistes 3 et 4). Après l'immunoprécipitation anti-PS1, les surnageants (fraction non-liée à la protéine A sépharose) ont subi une seconde immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PS2. Le SPA4CT est clairement détecté dans les cellules cotransfectées avec PS1 et SecPS2Nt (Fig10B, pistes 3 et 4) démontrant que dans ces cellules, SecPS2Nt en se fixant, a déplacé la fixation de SPA4CT sur PS1. Cette expérience nous permet donc de conclure que SecPS2Nt est une molécule capable non seulement de se fixer sur APP, mais aussi de déplacer la fixation de APP sur PS1 et vraisemblablement PS2. SecPS2Nt peut donc en cellules servir de leurre pour bloquer l'interaction APP avec les deux présénilines, PS1 et PS2. En effet, les résultats de la cartographie de l'interaction PS1/APP, confirment que les zones d'interaction mises en jeu sont similaires à celles de PS2.

**Exemple 10. Le blocage de l'interaction APP/PS1 conduit à l'inhibition de la production du peptide amyloïde A $\beta$ 42 intracellulaire.**



L'exemple précédent démontre que l'expression de SecPS2NT peut bloquer l'interaction entre APP et PS1 ou PS1 mutant. Le présent exemple analyse les conséquences de cette inhibition sur la production du peptide amyloïde, en particulier de ces deux formes A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42. En effet, il a été précédemment décrit dans la littérature que les mutations pathologiques des présénilines (PS1 ou PS2) conduisaient à une augmentation du ratio de la forme longue du peptide A $\beta$ , forme A $\beta$ 42, sur la forme A $\beta$ 40, ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Borchelt et coll. 1996 et pour revue Hardy, 1997).

SPA4CT a été coexprimé avec PS1 wt (Fig 13 A, pistes 1 & 3) ou avec PS1 mutant (Fig 13 A, pistes 2 & 4) soit en l'absence (pistes 1 & 2) soit en présence de SecPS2NT (pistes 3 & 4). Les lysats cellulaires et les milieux conditionnés des cellules ont été analysés pour la production du peptide amyloïde. Les formes A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 ont été analysée par immunoprécipitation avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les extrémités C-terminales A $\beta$ 40 (FCA3340) ou A $\beta$ 42 (FCA3542, Barelli et coll., 1997) et les immunoprécipitats analysés par immunoblot avec un anticorps reconnaissant les deux formes. Dans les lysats cellulaires, l'expression de PS1 mutant conduit bien à une augmentation de la production de A $\beta$ 42 (1.5 à 2 fois) et de ses formes multimériques par rapport à PS1wt et peu de variation des niveaux de A $\beta$ 40 (comparer Fig 13 A, pistes 1 et 2, panels A $\beta$ 42 et A $\beta$ 40 lysats cellulaires) comme attendu. En présence de SecPS2NT, les niveaux de A $\beta$ 42 (et multimères) sont considérablement réduits (Fig 13 A, pistes 3 et 4) autant avec PS1 wt que PS1 mutant. Dans le milieu extracellulaire, les niveaux de A $\beta$ 42 semblent aussi diminués mais de façon moins importante. Il n'y a pas de variation des niveaux de peptide amyloïde A $\beta$ 40 entre les différentes conditions ce qui démontre que l'effet sur le A $\beta$ 42 est spécifique et n'est pas dû à une modification globale des niveaux d'expression. Ceci est confirmé par l'analyse de l'expression des différents gènes transfectés: SPA4CT,

SecPS2NT et PS1 (Fig 13B). Dans cet exemple, il a donc été démontré qu'inhiber l'interaction PS1/APP avec le dominant génétique SecPS2NT conduit à une diminution des niveaux de production de A $\beta$ 42 intracellulaire autant avec PS 1mutant qu'avec PS1 wt. En regard du rôle primordial accordé au A $\beta$ 42 dans le développement de la maladie d'Alzheimer, cet exemple apporte la démonstration que l'inhibition de l'interaction APP/PS représente donc une cible thérapeutique importante autant pour les formes génétiques que les formes sporadiques de la maladie.

**Exemple 11. Détection de l'interaction de PS2 avec l'APP endogène des cellules COS à l'aide d'un traitement pharmacologique.**

Cet exemple a pour but de démontrer que les résultats obtenus dans les exemples précédents (ces résultats en cellules, correspondaient à la surexpression des deux partenaires de l'interaction APP et PS (PS1 ou PS2)) sont également valables avec des protéines non surexprimées ou endogènes. En effet, la forte surexpression des deux protéines pourrait conduire à un artefact d'interaction. La détection de l'interaction dans des conditions n'impliquant pas la surexpression simultanée des deux partenaires a été recherchée dans cet exemple.

Les cellules COS expriment l'APP de façon endogène bien qu'à de faibles niveaux. Les cellules COS ont donc été transfectées avec PS2 seulement. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre le peptide du N-term de PS2 et révélés par immunoblotting avec l'anticorps anti-APP, WO2. Le panneau supérieur de la figure 14 montre que la transfection avec PS2 seul ne permet pas de détecter d'interaction avec APP endogène par coimmunoprécipitation (Fig 14, piste 1).

Par ailleurs, puisque l'interaction APP/PS conduit à la production du peptide amyloïde A $\beta$ 42 (exemple précédent), donc au catabolisme de l'APP,

au niveau du reticulum endoplasmique, le protéasome qui est le système de dégradation protéolytique dans ce compartiment cellulaire pourrait être impliqué. L'effet de la lactacystine, un inhibiteur sélectif du protéasome a été analysé. Après incubation des cellules transfectées avec PS2 en présence de lactacystine, l'APP endogène des cellules COS peut être clairement mis en évidence dans les immunoprécipitats PS2 (Fig 14, piste 5, bande à 110 kDa). Cette interaction avec l'APP endogène présente les mêmes caractéristiques que précédemment puisqu'elle peut-être déplacée par le dominant génétique SecPS2NT (Fig 14, pistes 6 et 7) avec un effet dose-dépendant. En effet, la piste 7 montre qu'à un dosage modéré de SecPS2NT, une bande de faible intensité correspondant à l'APP endogène est toujours visible. A un dosage plus important de SecPS2NT (piste 6), la bande correspondant à l'APP endogène apparait très faiblement et démontre le caractère dosage dépendant. Un faible signal résiduel APP est toujours présent (bande à environ 110 kDa) et est dû au complexe entre APP et SecPS2NT qui est rapidement sécrété (puisque SecPS2NT n'a plus de domaines transmembranaires d'ancrage) et donc ne s'accumule pas intracellulairement.

La Figure 14 (panneau milieu et inférieur) montre que le traitement à la lactacystine n'affecte pas les niveaux d'APP totaux autant cellulaires que sécrétés. En effet, les bandes correspondant aux niveaux d'expression de l'APP sont quasiment constantes en intensité. La spécificité de l'effet lactacystine est ainsi démontré sur la sous-population d'APP en interaction avec PS2.

Par ces résultats, il a pu être démontré que l'interaction APP/PS2 peut être détectée avec l'APP endogène des cellules COS si le protéasome est inhibé. En outre, ces résultats démontrent que l'interaction APP/PS2 peut être détectée dans des conditions moins artificielles. Cependant cette interaction est très labile. Aussi, afin d'obtenir une détection plus marquée, il a été recouru soit à un inhibiteur de dégradation protéolytique dans le

présent exemple soit à la surexpression des deux partenaires dans les exemples précédents. Cet exemple démontre donc que les résultats obtenus dans les exemples précédents avec surexpression en cellule des deux partenaires de l'interaction (APP et PS1 ou PS2) sont également valables avec des protéines non surexprimées ou endogènes.

**Exemple 12. PS2 interagit avec un deuxième segment de APP, autre que A $\beta$ .**

Cet exemple a pour but de démontrer qu'un autre segment de APP interagit avec PS2.

Il a été précédemment démontré que SecPS2NT interagit dans le milieu extracellulaire avec les formes sécrétées de APP (Fig3A, piste 4). Les formes sécrétées de l'APP sont libérées après clivage soit au site  $\beta$  (position 595), correspondant au début du peptide A $\beta$ , soit au site  $\alpha$  (position 612) au sein même de ce peptide. Ces résultats suggèrent que PS2NT interagit aussi avec une région N-term de l'APP différente de A $\beta$ . Des formes tronquées de APP ont été construites, par insertion d'un codon stop aux sites  $\beta$  ( $\beta$ -sAPP) et  $\alpha$  ( $\alpha$ -sAPP) et ont été testées. PS2 complet et SecPS2NT interagissent effectivement avec  $\alpha$ -sAPP (Fig 15, pistes 3 et 5) et  $\beta$ -sAPP (Fig 15, pistes 4 et 6). Ces résultats établissent qu'un segment de APP compris entre la position 1 et 595 (et donc autre que le A $\beta$ ) est également capable d'interagir avec PS2 et PS2NT. Ces résultats permettent en outre de confirmer que l'interaction PS2NT/APP peut avoir lieu en absence d'ancrage à la membrane des deux partenaires et dans le compartiment luminal (ou extracellulaire) de la cellule.

### Références

- Doan et col. (1996) Protein topology of presenilin1. *Neuron* 17:1023-1030.
- 5 -Thinakaran et col., (1996) Endoproteolysis of Presenilin1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17:181-190.
- Podlisny et col., (1997) Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiology of Disease* 3:325-337.
- 10 -Pradier, L., Czech, C., Mercken, L., Revah, F. and Imperato, A. (1996) Biochemical characterization of presenilins (S182 and STM2) proteins. *Neurobiol. Aging* 17: S137
- Scheuner et coll. (1996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2: 15 864-870.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Mönning, U., Urmoneit, B., Turner, J. and Beyreuther, K. (1993) Generation of bA4 from the amyloid protein precursor and fragment thereof. *FEBS Lett.* 335:89-93.
- 20 -Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C., & Beyreuther, K. (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and b-Amyloid precursor protein. *Nature Medicine* 3: 328-332
- Blanchard, V., Czech, C., Bonici, B., Clavel, N., Gohin, M., Dalet, K., Revah, F., 25 Pradier, L., Imperato, A. and S. Moussaoui. (1997) Immunohistochemical analysis of presenilin 2 expression in the mouse brain: distribution pattern and co-localization with presenilin 1 protein. *Brain Res.* 758:209-217.
- Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.-M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R.,

- Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N., Price, D.L., Younkin, S.G. and S. Sisodia (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Ab1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17: 1005-1013
- 5 -Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.-M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L, Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M.N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. and S. Younkin (1996) Increased amyloid-b42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin1. *Nature* 383:710-713.
- 10 -Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosci.* 20: 154-159.
- Stephens, D.J. and B.M. Austen (1996) Metabolites of the b-amyloid precursor protein generated by b-secretase localise to the Trans-Golgi Network and late endosome in 293 cells. *J. Neurosci. Res* 46:211-225.
- 15 -Essalmani, R., Guillaume, J.-M., Mercken, L., and Octave, J.-N. (1996). Baculovirus-Infected Cells Do not Produce the Amyloid Peptide of Alzheimer's Disease from its Precursor. *FEBS Lett.* 389: 157-161.
- 20 - Barelli et coll., (1997), Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid  $\beta$  peptides : their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Molecular Medecine* 3:695-707.

### REVENDICATIONS

1. Polypeptide capable d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.
- 5        2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie de PS2 permettant l'interaction avec le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.
3. Polypeptide selon la revendication 2 caractérisé en ce que la partie de PS2 correspond au fragment N-terminal hydrophile de PS2.
- 10       4. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.
5. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie de PS1 permettant l'interaction avec le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.
- 15       6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.
7. Polypeptide selon l'une des revendication 1 à 6 caractérisé en ce qu'il  
20 comprend au moins les régions d'homologie communes aux séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

8. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins une partie du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde hormis la partie correspondant au peptide  $\beta$ -amyloïde.

5 9. Polypeptide selon la revendication 8 caractérisé en ce que la partie du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde comprend tout ou partie du fragment 1-596.

10. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il comporte tout ou partie d'une séquence choisie parmi la séquence correspondant au fragment 1-596 de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

10 11. Composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde obtenu par reproduction des motifs actifs des peptides selon les revendications 1 à 10 par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

15 12. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence signal.

13. Polypeptide selon la revendication 12 caractérisé en ce que la séquence signal est choisie parmi la séquence du peptide signal de IgkB, le peptide signal de l'APP, les peptides signal des sous-unités des récepteur nicotinique de l'acétylcholine musculaires et centraux

20 14. Polypeptide selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide comprenant l'extrémité N-Terminale de PS1 ou de PS2.



15. Polypeptide selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide comprenant les 87 premiers résidus de l'extrémité N-Terminale de PS2 et le peptide signal de IgkB.

5 16. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 15.

17. Séquence nucléotidique selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°1 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

10 18. Séquence nucléotidique selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou d'une séquence dérivée de celle-ci.

19. Séquence nucléotidique selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence comprenant essentiellement les zones d'homologies communes aux séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

15 20. Séquence nucléotidique selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence correspondant au fragment 1-596 (acides nucléiques 1 à 1788) de la séquence SEQ ID N°3, ou une séquence dérivée.

20 21. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 16 à 20 dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit.

22. Cellule hôte pour la production d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce qu'elle a été transformée avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 16 à 20.

23. Anticorps ou fragment d'anticorps caractérisé en ce qu'il est dirigé  
5 contre un polypeptide dont la séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 ou les fragments désignés de la SEQ ID N°3 et en ce qu'il possède la faculté d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.

24. Procédé de mise en évidence ou d'isolement de composés capables  
10 d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de marquage des présénilines et/ou de l'APP ou des fragments de ceux-ci et une étape de détection de l'inhibition de l'interaction soit entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-terminale des présénilines soit entre les protéines  
15 complètes APP et présénilines.

25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que les composés isolés par le procédé sont capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2.

26. Procédé selon l'une des revendications 24 à 25 caractérisé en ce que l'on réalise  
20 les étapes suivantes :

- Le peptide  $A\beta_{1-42}$  est absorbé au préalable sur une membrane de nitrocellulose par incubation.

- un extrait bactérien contenant tout ou partie d'une préséniline (PS1 ou PS2) et avantageusement l'extrémité N-Terminale, est ensuite ajouté pour incubation avec la molécule ou un mélange contenant différentes molécules à tester

5 - L'interaction de la préséniline avec le peptide  $A\beta_{1-42}$  sur le filtre de nitrocellulose est mise en évidence à l'aide de protéines marqueur des présénilines. Les molécules recherchées inhibent l'interaction et diminuent donc l'intensité du signal des protéines marqueur.

10 27. Procédé selon la revendication 26 caractérisé en ce que l'une des protéines marqueurs est la protéine fixatrice du S-tag, couplée à la phosphatase alcaline.

28. Procédé selon l'une des revendications 24 à 25 caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

- le peptide  $A\beta_{1-42}$  est incubé au préalable sur une plaque contenant des puits (format 96 puits ou supérieur)
- 15 - l'extrémité N-terminale d'une préséniline recombinante purifiée est ensuite ajoutée avec la molécule ou un mélange contenant différentes molécules à tester, pour incubation
- Après lavages, l'interaction de la préséniline avec le peptide  $A\beta_{1-42}$  dans la plaque est mise en évidence à l'aide de protéines marqueur des présénilines. La  
20 perte de l'interaction entre les présénilines et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde est détectée après révélation avec un substrat colorimétrique, par spectrophotométrie.

29. Procédé selon la revendication 28 caractérisé en ce que l'une des protéines marqueurs est la protéine fixatrice du S-tag, couplée à la phosphatase alcaline et la révélation de la perte de l'interaction est effectuée à 450 nm .

30. Procédé selon l'une des revendications 24 à 25 caractérisé en ce que  
5 l'on réalise les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules avec le peptide A  $\beta_{1-42}$  synthétisé avec une biotine et un bras de 3  $\beta$ Alanines (ou de 3 lysines) à son extrémité N-terminale (en amont de la position  
1)

10 - on incube le mélange réactionnel précédent avec l'extrémité N-terminale d'une préséniline purifiée marquée à l'aide d'un premier fluorophore.

- on ajoute une streptavidine couplée à un second fluophore capable d'être excité à la longueur d'onde d'émission du premier fluophore afin qu'il bénéficie d'un transfert de fluorescence si les deux fluorophores se trouvent à forte proximité.

15 - la mise en évidence des nouveaux composés inhibant l'interaction est détectée par spectrofluorométrie à la longueur d'émission du premier fluophore et/ou en mesurant la diminution du signal à la longueur d'onde d'émission du second fluophore

31. Procédé selon la revendication 30 caractérisé en ce que le premier  
20 fluophore est le cryptate d'Europium et le second fluophore est la XL665

32. Procédé selon la revendication 31 caractérisé en ce que la révélation de la perte de l'interaction est effectuée à 620 nm et/ou par mesure de la diminution du signal à 665 nm.

33. Procédé selon l'une des revendications 24 à 25 comportant les étapes suivantes :

- on met en contact un mélange a) de lysats cellulaires contenant tout ou partie d'une préséniline (PS1 ou PS2) et avantageusement l'extrémité N-Terminale,
- 5 b) de lysats cellulaires contenant l'APP, lysats obtenus à partir de cellules infectées par des virus et en particulier par des baculovirus et c) la molécule ou un mélange contenant différentes molécules à tester
- on co-immunoprécipite à l'aide d'anticorps appropriés les protéines solubilisées et correspondant aux présénilines ou à l'APP ou le peptide A  $\beta$
- 10 - la perte de la co-immunoprécipitation des présénilines et de l'APP est révélée par western blot avec des anticorps marqueurs indiquant que les molécules testées ont la propriété inhibitrice recherchée.

34. Test d'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde, et préférentiellement entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une

15 étape de transfert de fluorescence entre deux fluophores fixés aux molécules précédentes et une étape de révélation de l'interaction mesurée par fluorométrie .

35. Test de mise en évidence de molécules capables d'inhiber l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde, et préférentiellement entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et l'extrémité N-Terminale de PS2, caractérisé en ce que l'inhibition de la dite interaction est détectée selon le

20 procédé dans les revendications 24 à 33.

36. Ligand a) des polypeptides tel que défini selon les revendications 1 à 15,  
b) des présénilines et/ou du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou du peptide  $\beta$ -

amyloïde, et préférentiellement du peptide  $A\beta_{1-42}$  et/ou de l'extrémité N-Terminale de PS2, susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 24 à 33.

37. Virus recombinant défectif comprenant une séquence nucléotidique  
5 codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 15.

38. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 16 à 20.

39. Vecteur selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique.

10 40. Vecteur selon la revendication 38 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

41. Vecteur selon la revendication 40 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus défectif pour la réplication.

15 42. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs vecteurs selon l'une des revendications 37 à 41.

43. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 15.

20 44. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 23 et/ou un ligand selon la revendication 36.

45. Composition selon l'une des revendications 42 à 44 destinée à inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde.

5 46. Composition selon l'une des revendications 42 à 44 destinée au traitement des maladies neurodégénératives.

47. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 15 pour inhiber au moins en partie l'interaction entre une préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde

10

48. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 15 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer.

15 49. Utilisation des polypeptides selon les revendications 1 à 15 pour la mise en évidence de ligands des polypeptides, de ligands des présénilines, du précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou du peptide  $\beta$ -amyloïde, et préférentiellement du peptide  $A\beta_{1-42}$  et/ou de l'extrémité N-Terminale de PS2, et/ou de composés capables d'inhiber au moins en partie l'interaction entre une

20 préséniline et le précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et/ou le peptide  $\beta$ -amyloïde

50. Utilisation des sequences nucléotidiques selon les revendications 16 à 20 pour la construction d'une cassette d'expression utilisable dans un vecteur selon les revendications 37 à 41.

25

51. Cassette d'expression utilisable dans un vecteur défini selon les revendications 36 à 40 pour la production de polypeptides selon les revendications 1 à 15.

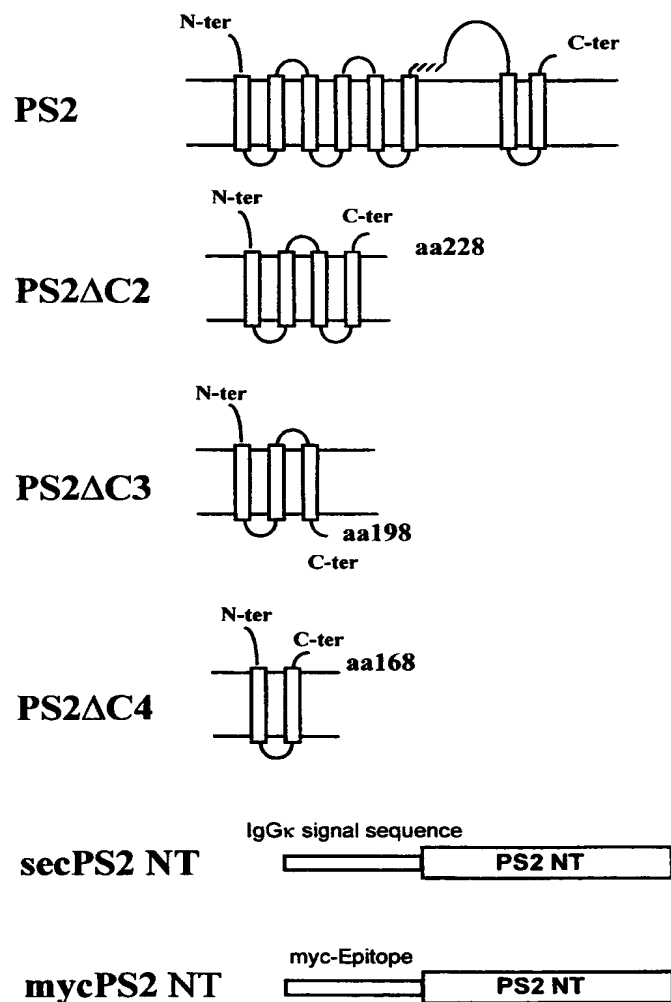


Figure 1A



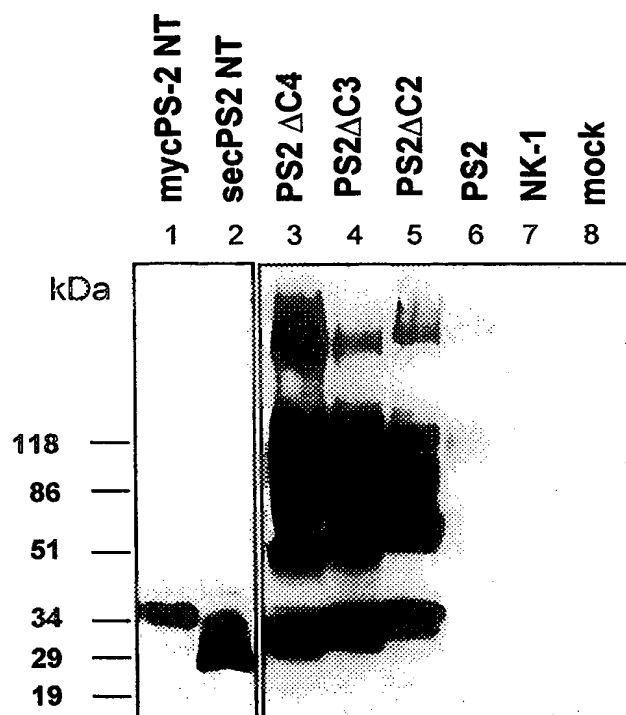


Figure1B

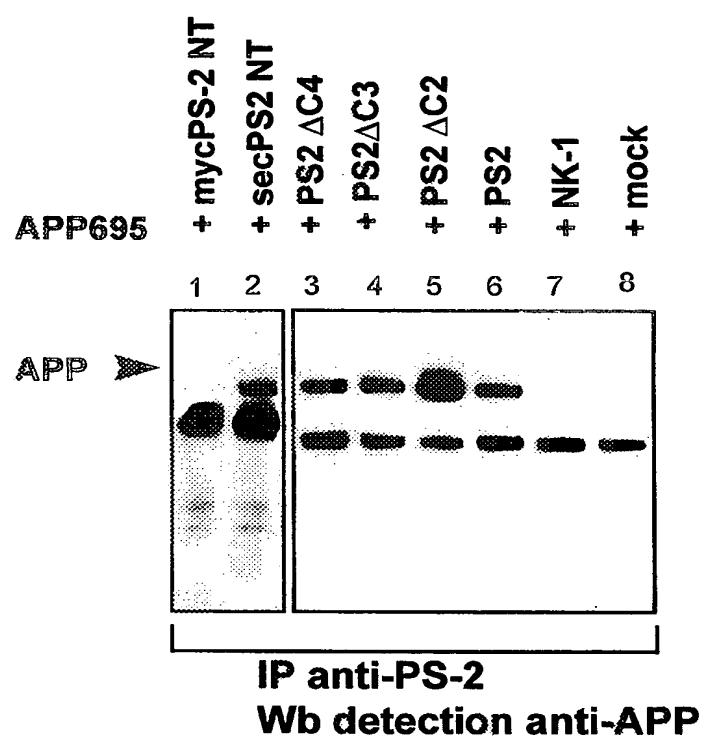


Figure 2.

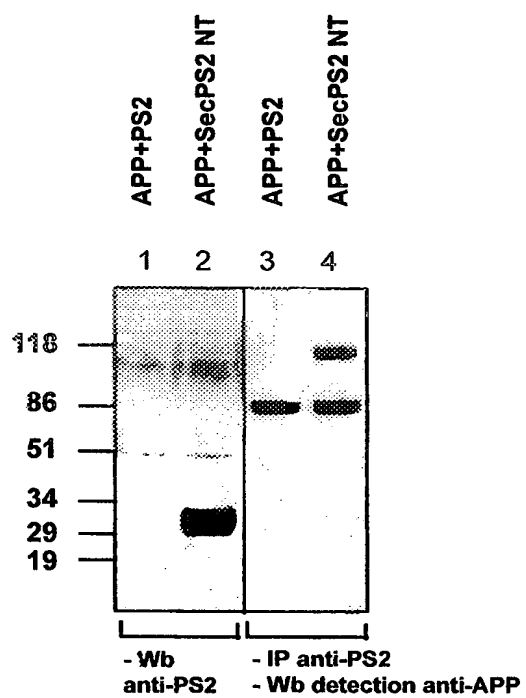


Figure 3A

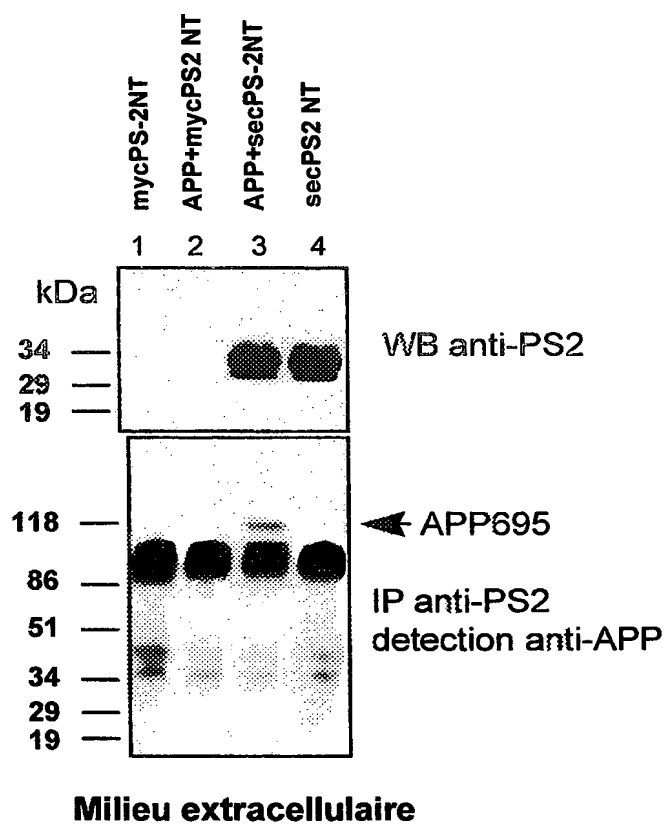


Figure 3B

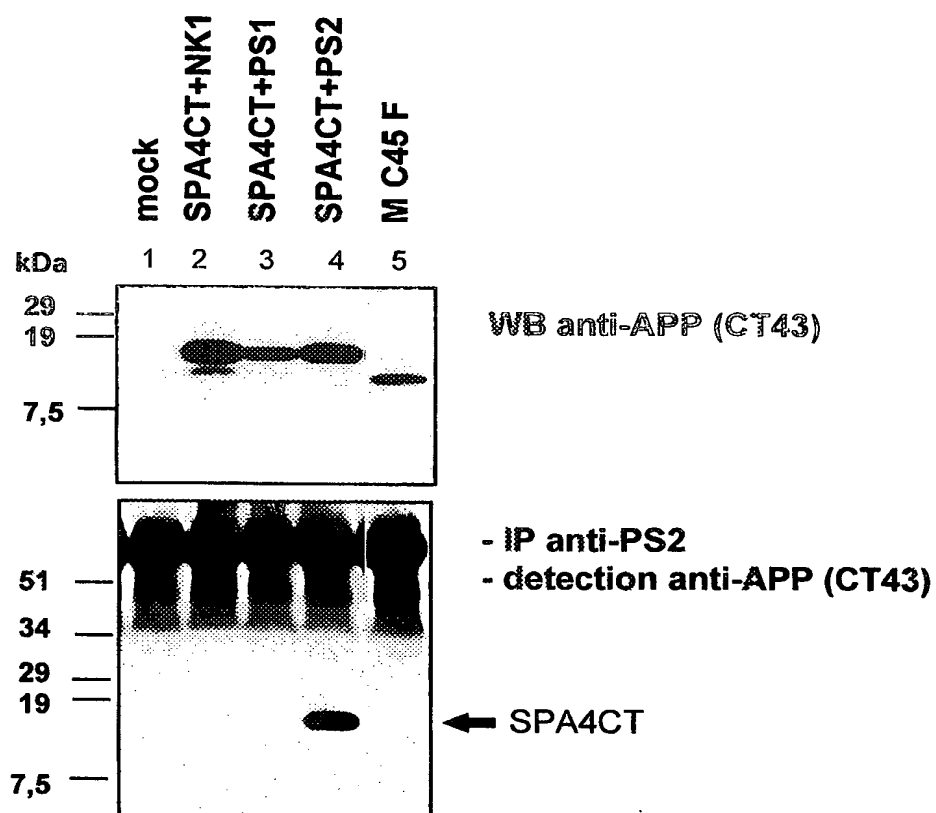


Figure 4A

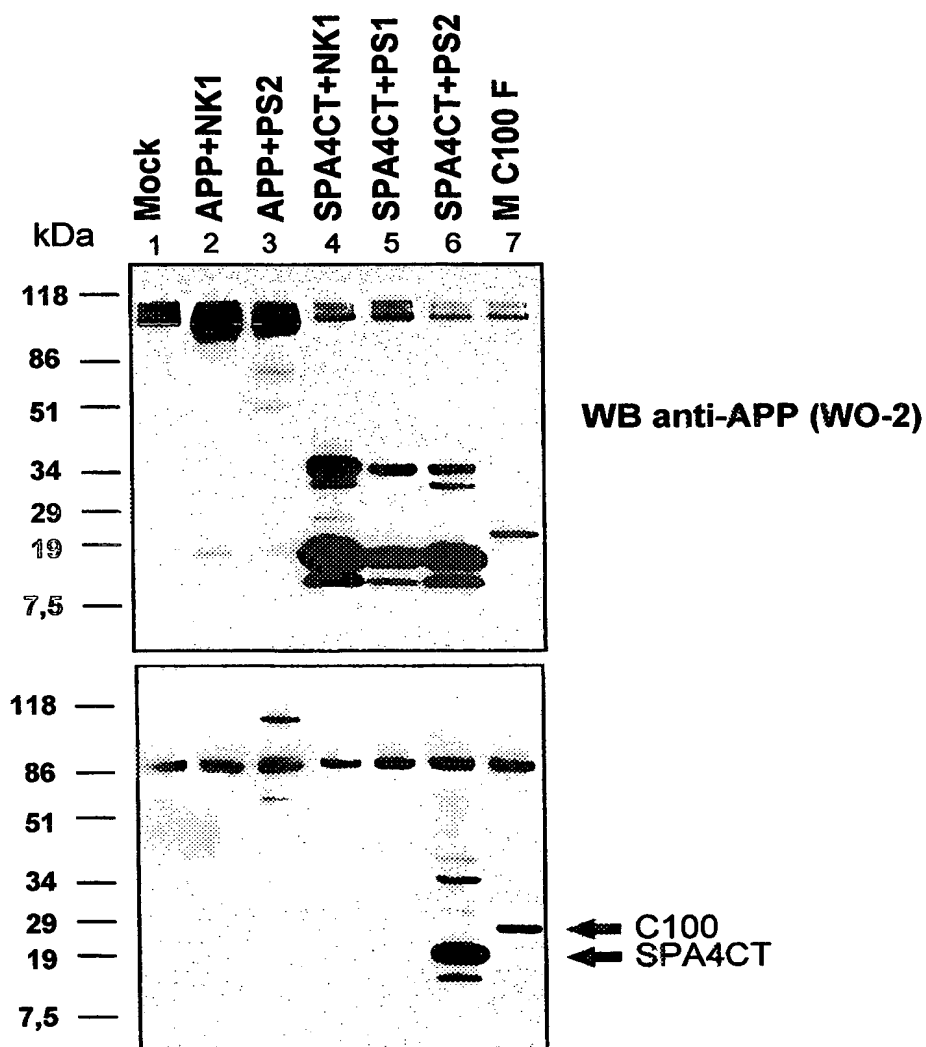


Figure 4B

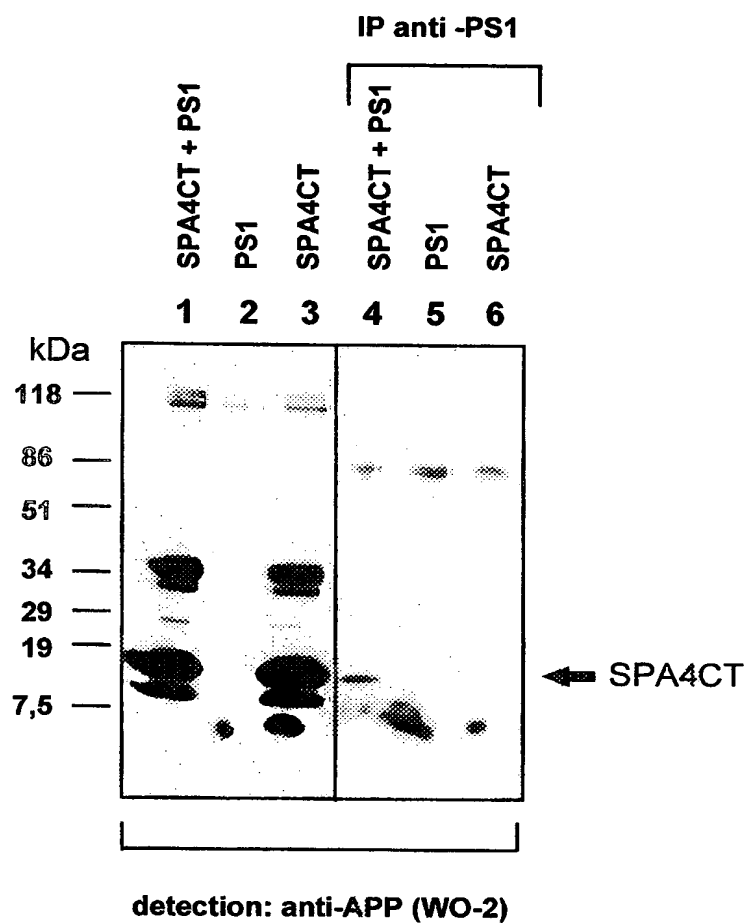


Figure 5A

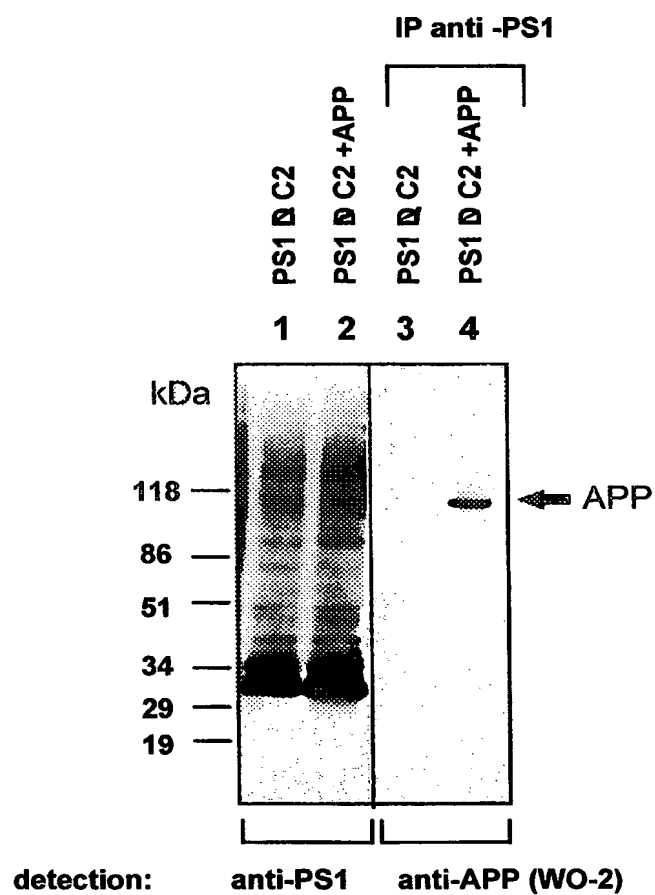


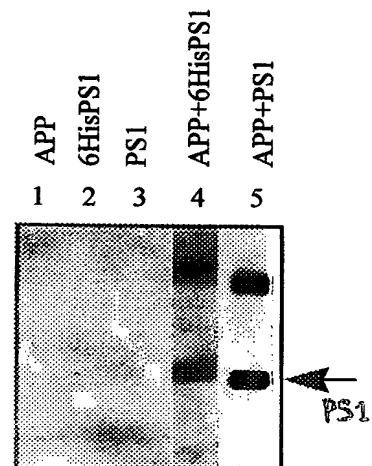
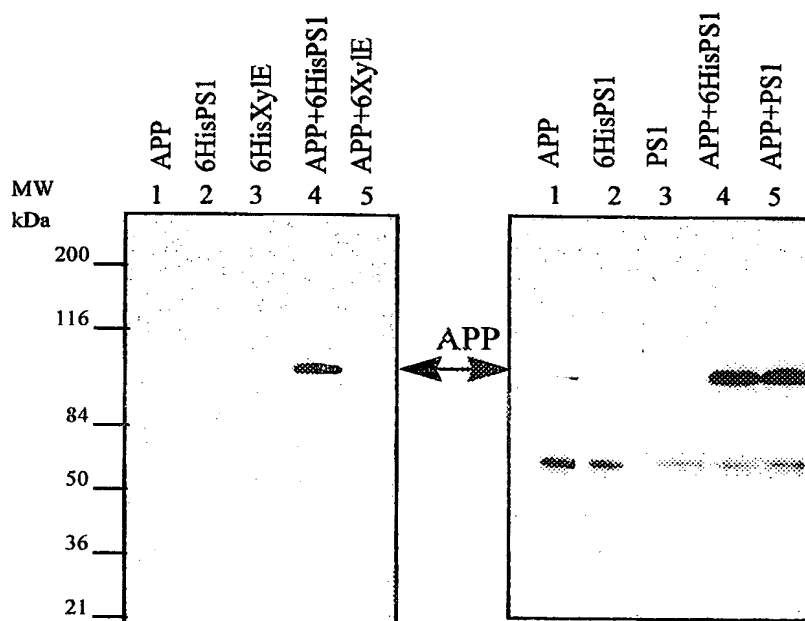
Figure 5B



IP:  
anti-Histidine

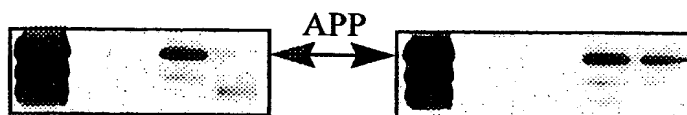
IP:  
anti-PS1

IP inverse:  
anti-APP



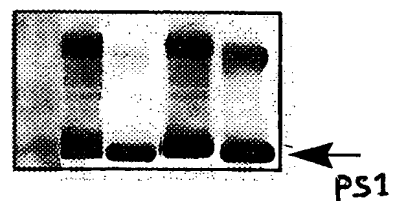
Lysats

Lysats



Blot: anti-APP

Blot: anti-APP



Blot: anti-PS1

Figure 6A

Figure 6B

Figure 6C

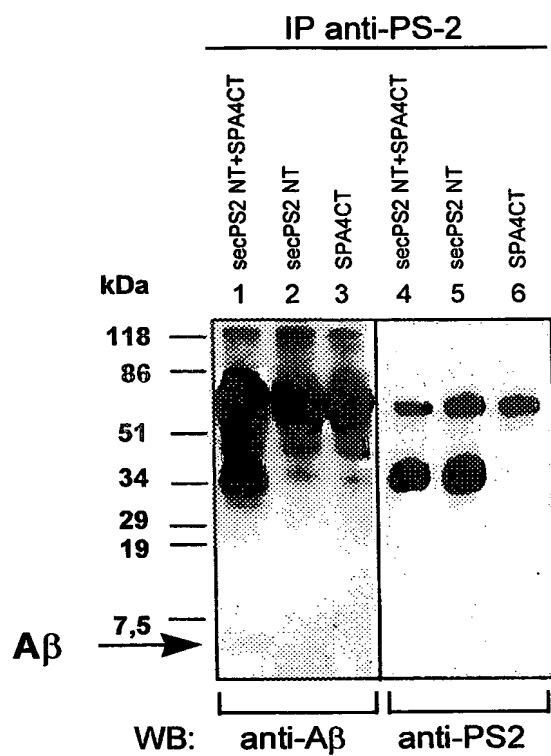


Figure 7

### Dose-dépendance en fonction de la concentration de PS2NT

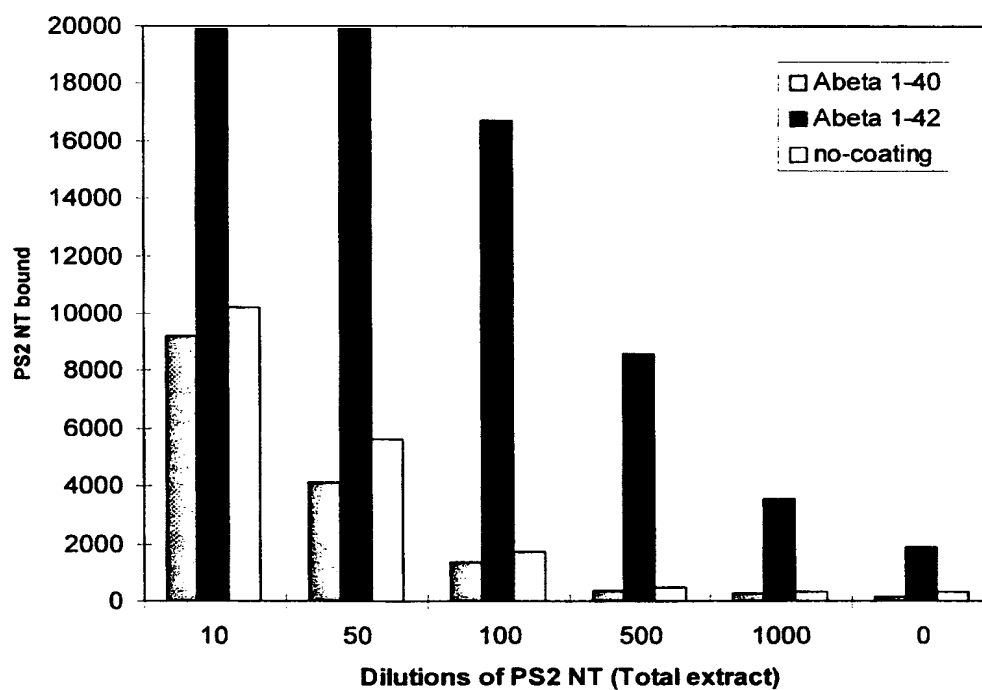


Figure 8A

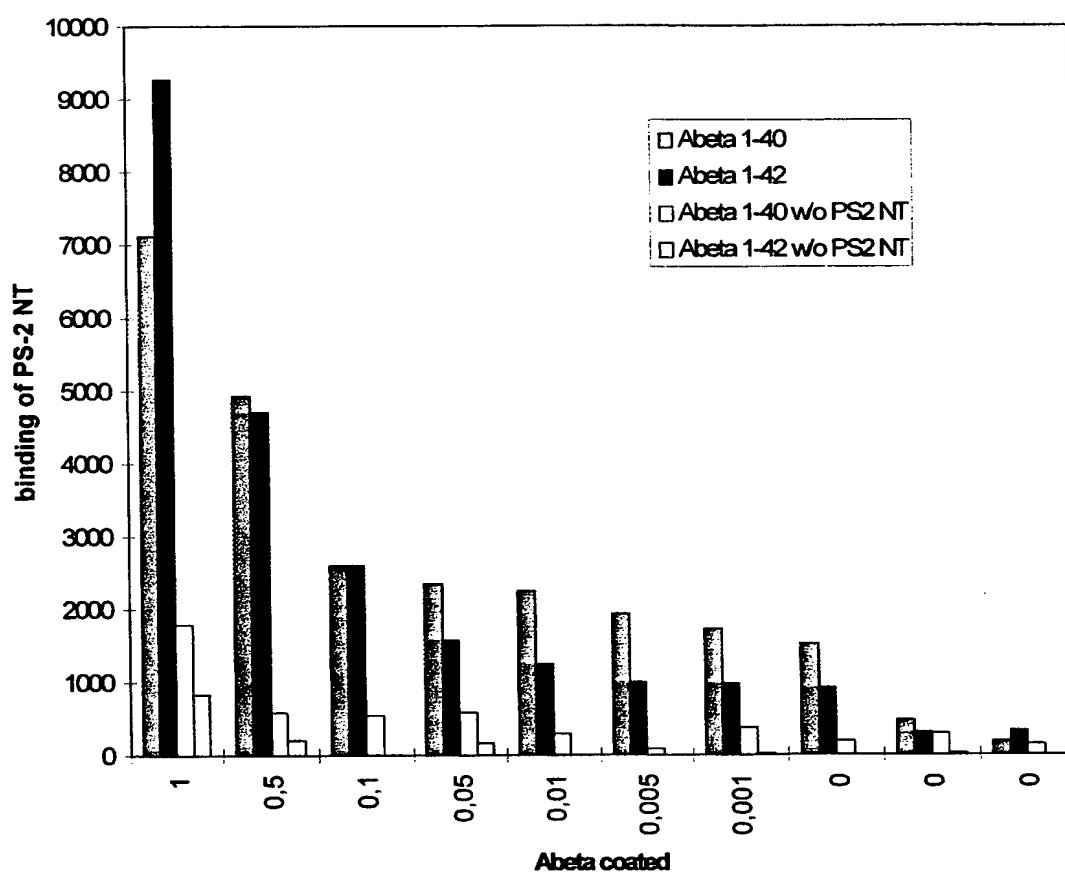
Dose-dépendance en fonction de la concentration de A $\beta$ 

Figure 8B

IP: anti-Histidine

IP: anti-PS1

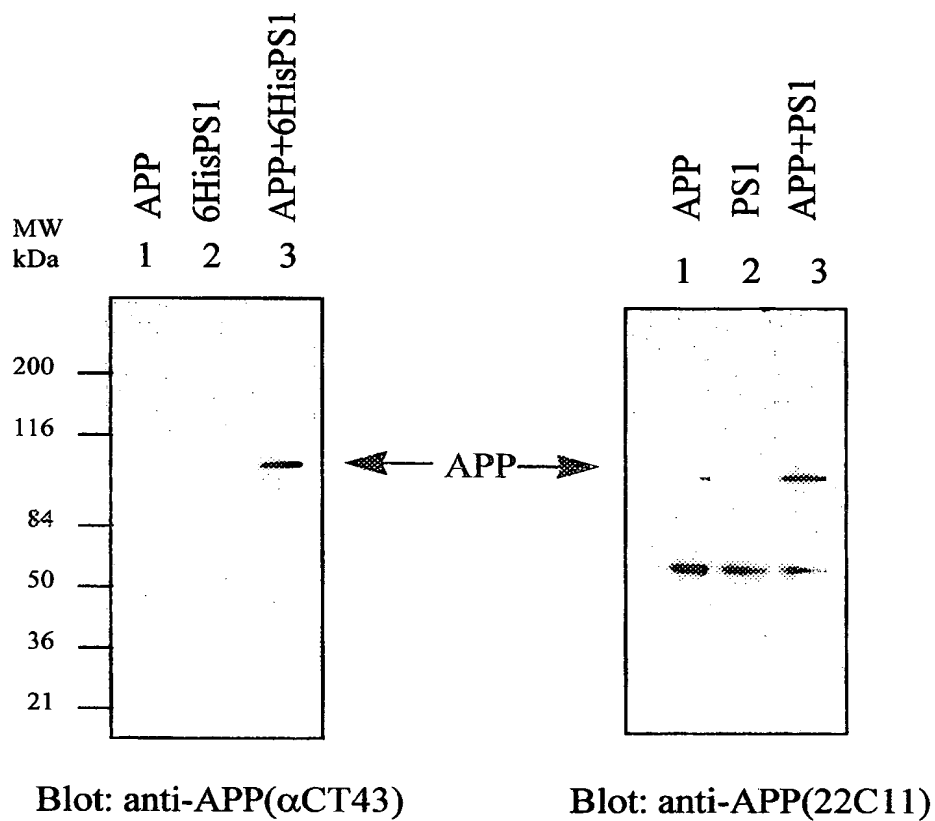


Figure 9A

Figure 9B

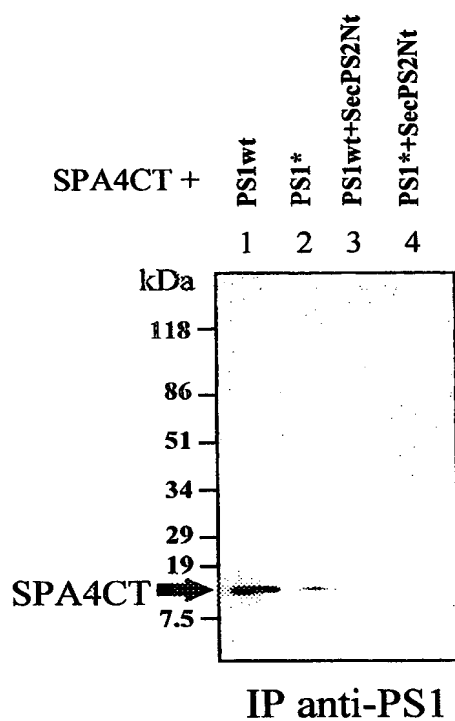


Figure 10A

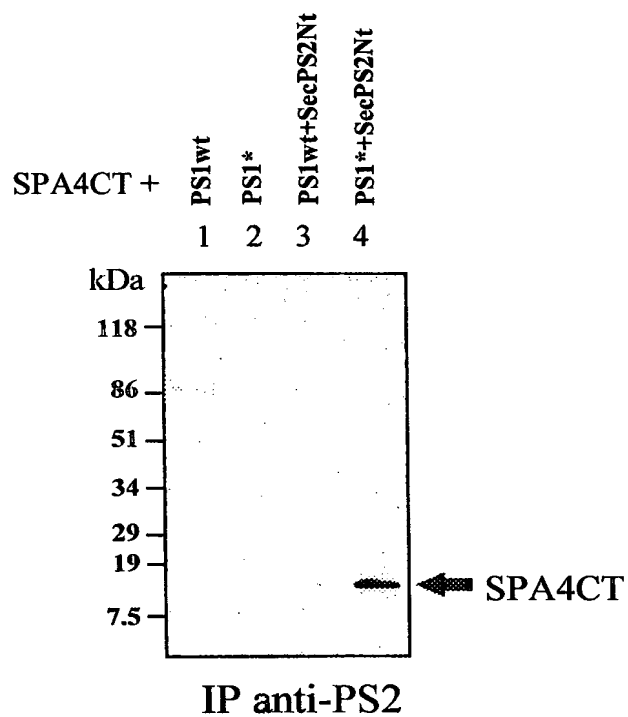


Figure 10B

WB WO2 (antiA $\beta$ )

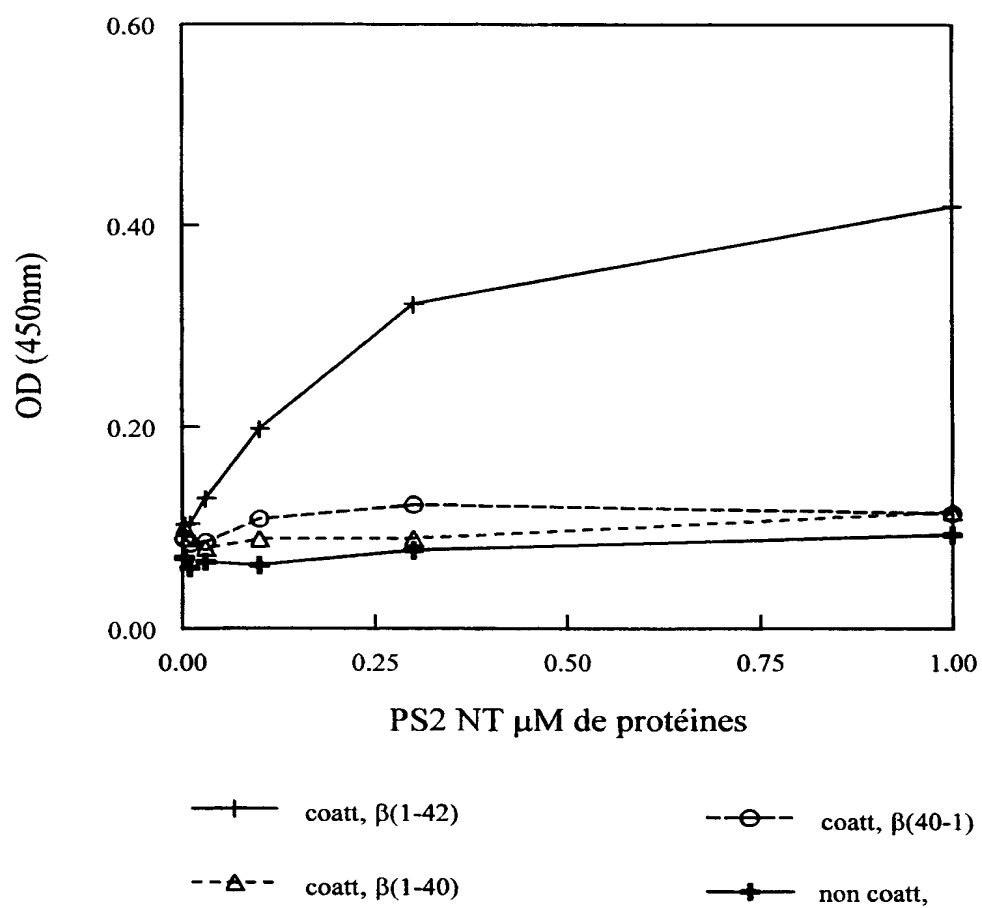
INTERACTION PS2NT/ $\beta$  amyloïde

Figure 11

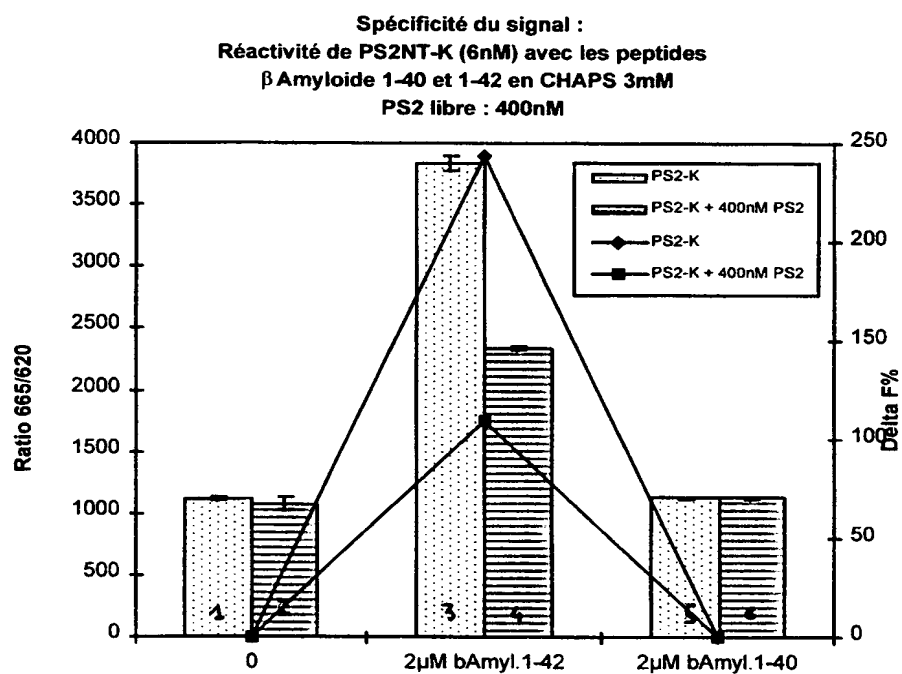


Figure 12



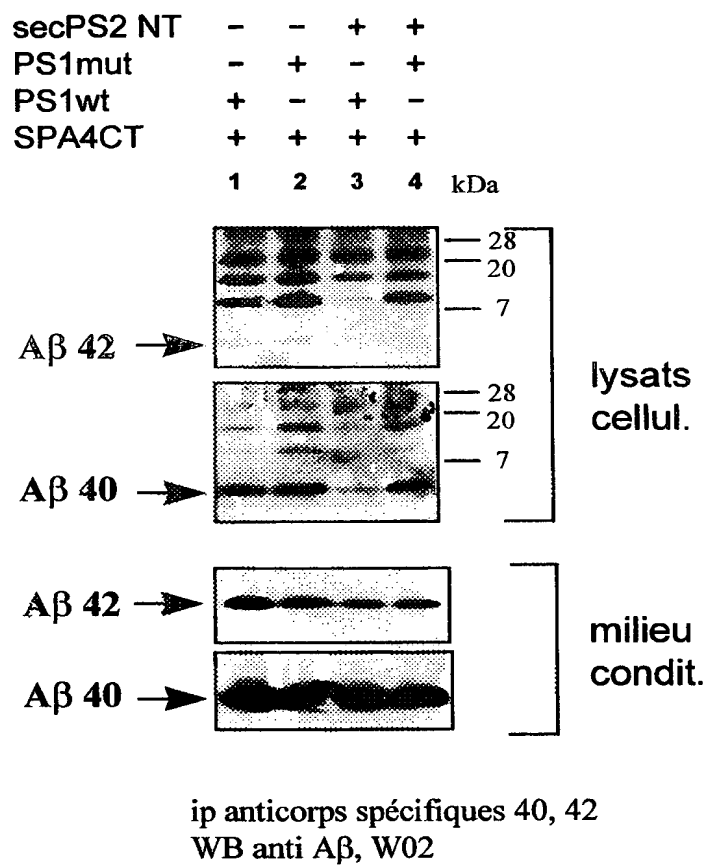


Figure 13A

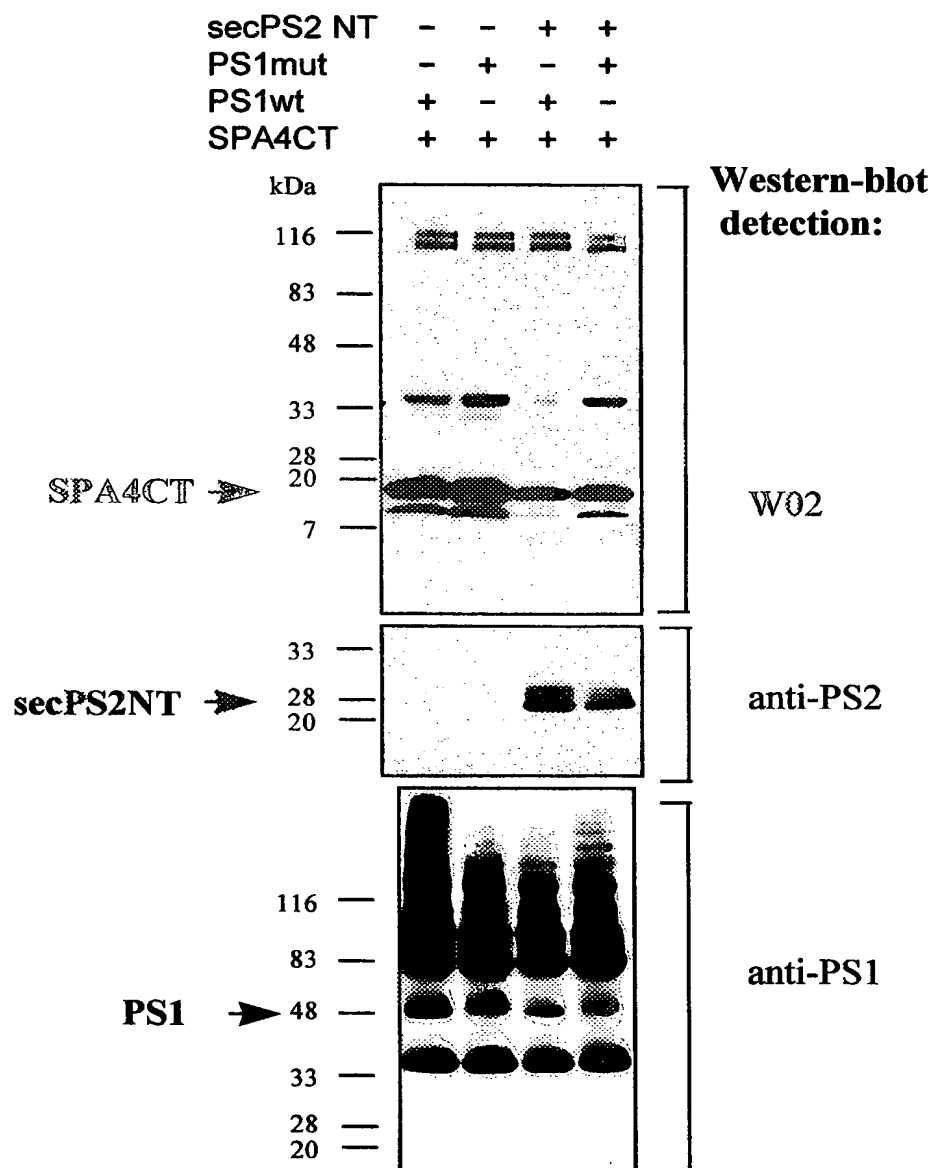


Figure 13B

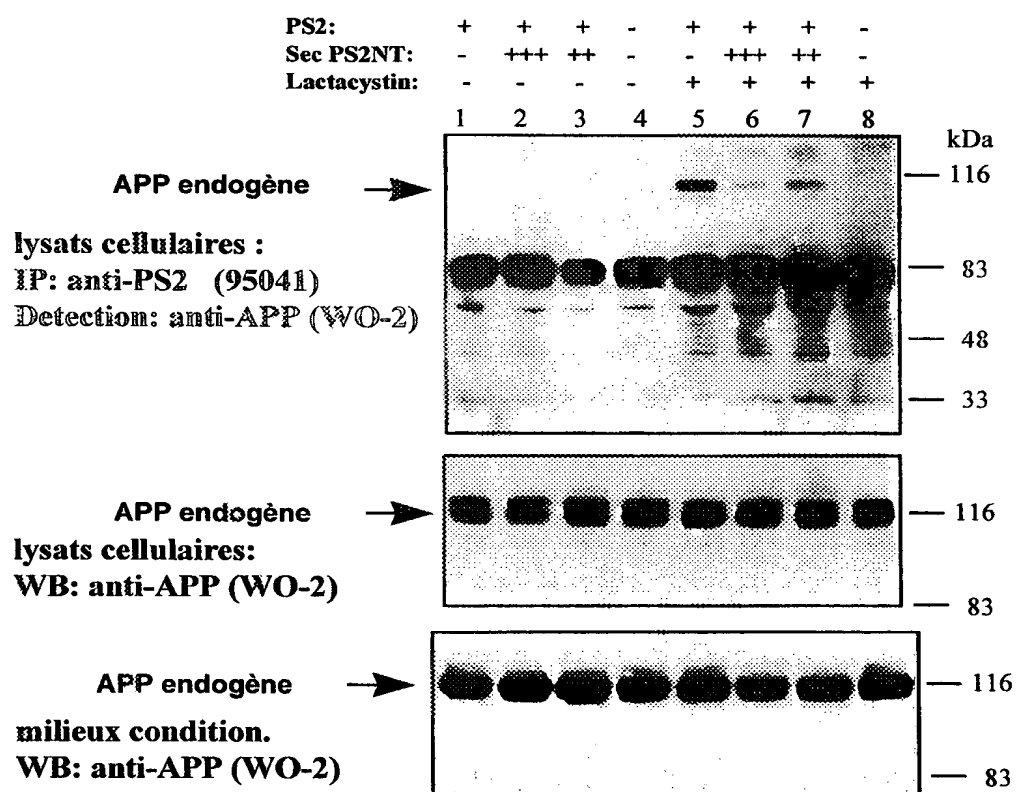


Figure 14

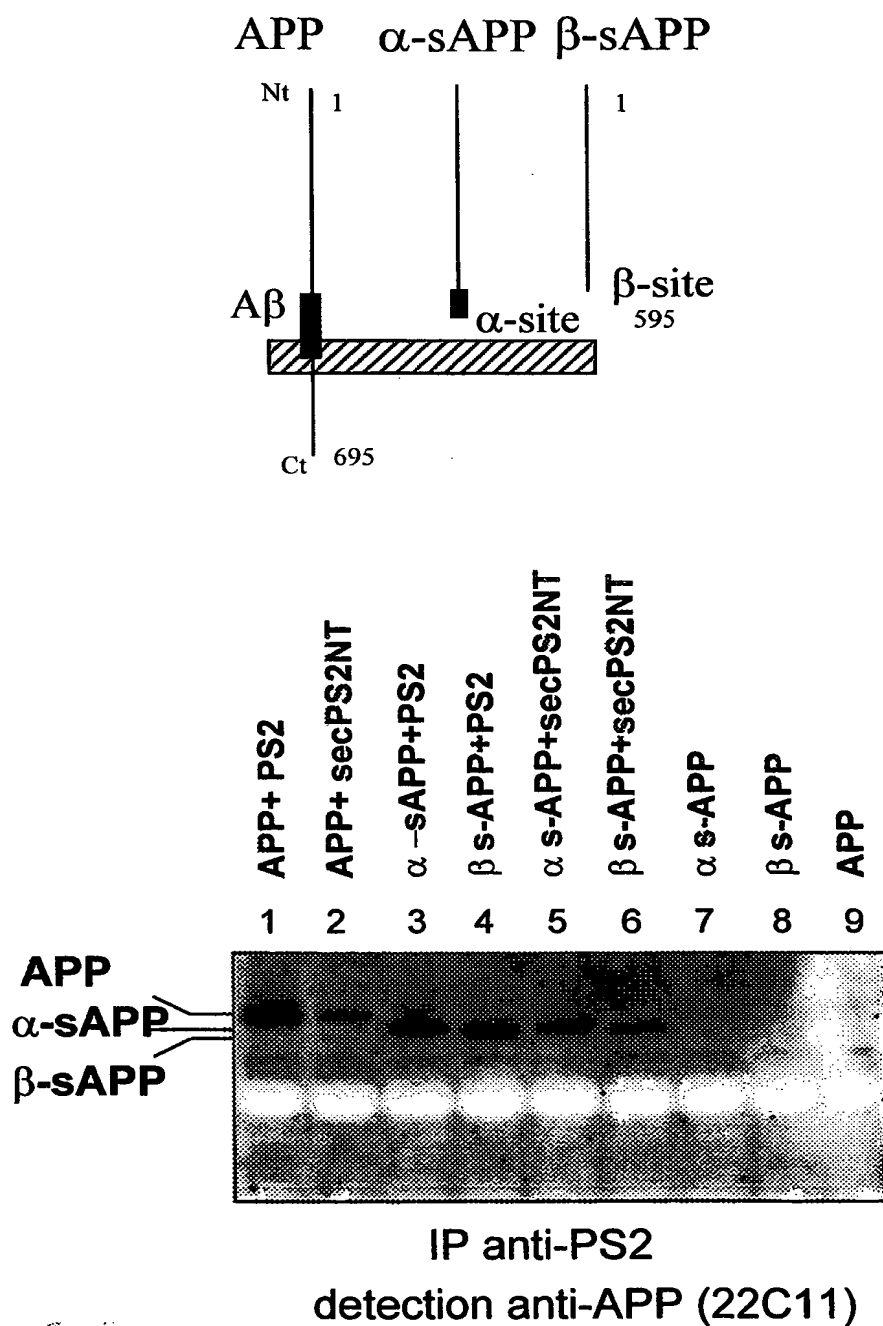


Figure 15

1/9

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER
- (B) RUE: 20 Avenue Raymond Aron
- (C) VILLE: Antony
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 92165
- (H) TELECOPIE: 01.55.71.72.91

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Peptides capables d'inhiber l'interaction entre les presenilines et le precurseur du peptide beta-amyloide et ou le peptide beta-amyloide et test d'interaction pour la recherche de molécules inhibitrices de ladite interaction.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 11

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 261 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..261

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG CTC ACA TTC ATG GCC TCT GAC AGC GAG GAA GAA GTG TGT GAT GAG	48
Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Glu Val Cys Asp Glu	
1 5 10 15	
CGG ACG TCC CTA ATG TCG GCC GAG AGC CCC ACG CCG CGC TCC TGC CAG	96
Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser Cys Gln	
20 25 30	
GAG GGC AGG CAG GGC CCA GAG GAT GGA GAG AAT ACT GCC CAG TGG AGA	144
Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln Trp Arg	
35 40 45	
AGC CAG GAG AAC GAG GAG GAC GGT GAG GAG GAC CCT GAC CGC TAT GTC	192
Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg Tyr Val	
50 55 60	

2/9

TGT AGT GGG GTT CCC GGG CGG CCG CCA GGC CTG GAG GAA GAG CTG ACC	240
Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Leu Thr	
65 70 75 80	
CTC AAA TAC GGA GCG AAG CAT	261
Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His	
85	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 243 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..243

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA CAG ATG	48
Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met	
1 5 10 15	
TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT GAC AAT	96
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn	
20 25 30	
AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT GAG	144
Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu	
35 40 45	
CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG GAG	192
Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu	
50 55 60	
CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC AAG	240
Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys	
65 70 75 80	
CAT	243
His	

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2088 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

3/9

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT:1..2088

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG	CTG	CCC	GGT	TTG	GCA	CTG	CTC	CTG	CTG	GCC	GCC	TGG	ACG	GCT	CGG	48
Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	Ala	Arg	
1				5					10					15		
GCG	CTG	GAG	GTA	CCC	ACT	GAT	GGT	AAT	GCT	GGC	CTG	CTG	GCT	GAA	CCC	96
Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	
			20					25					30			
CAG	ATT	GCC	ATG	TTC	TGT	GGC	AGA	CTG	AAC	ATG	CAC	ATG	AAT	GTC	CAG	144
Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His	Met	Asn	Val	Gln	
		35					40					45				
AAT	GGG	AAG	TGG	GAT	TCA	GAT	CCA	TCA	GGG	ACC	AAA	ACC	TGC	ATT	GAT	192
Asn	Gly	Lys	Trp	Asp	Ser	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Thr	Cys	Ile	Asp	
	50					55					60					
ACC	AAG	GAA	GGC	ATC	CTG	CAG	TAT	TGC	CAA	GAA	GTC	TAC	CCT	GAA	CTG	240
Thr	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Gln	Tyr	Cys	Gln	Glu	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	
65					70				75					80		
CAG	ATC	ACC	AAT	GTG	GTA	GAA	GCC	AAC	CAA	CCA	GTG	ACC	ATC	CAG	AAC	288
Gln	Ile	Thr	Asn	Val	Val	Glu	Ala	Asn	Gln	Pro	Val	Thr	Ile	Gln	Asn	
				85					90					95		
TGG	TGC	AAG	CGG	GGC	CGC	AAG	CAG	TGC	AAG	ACC	CAT	CCC	CAC	TTT	GTG	336
Trp	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Gln	Cys	Lys	Thr	His	Pro	His	Phe	Val	
			100					105					110			
ATT	CCC	TAC	CGC	TGC	TTA	GTT	GGT	GAG	TTT	GTA	AGT	GAT	GCC	CTT	CTC	384
Ile	Pro	Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Gly	Glu	Phe	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	Leu	
		115					120					125				
GTT	CCT	GAC	AAG	TGC	AAA	TTC	TTA	CAC	CAG	GAG	AGG	ATG	GAT	GTT	TGC	432
Val	Pro	Asp	Lys	Cys	Lys	Phe	Leu	His	Gln	Glu	Arg	Met	Asp	Val	Cys	
	130					135					140					
GAA	ACT	CAT	CTT	CAC	TGG	CAC	ACC	GTC	GCC	AAA	GAG	ACA	TGC	AGT	GAG	480
Glu	Thr	His	Leu	His	Trp	His	Thr	Val	Ala	Lys	Glu	Thr	Cys	Ser	Glu	
145					150				155					160		
AAG	AGT	ACC	AAC	TTG	CAT	GAC	TAC	GGC	ATG	TTG	CTG	CCC	TGC	GGA	ATT	528
Lys	Ser	Thr	Asn	Leu	His	Asp	Tyr	Gly	Met	Leu	Leu	Pro	Cys	Gly	Ile	
				165					170					175		
GAC	AAG	TTC	CGA	GGG	GTA	GAG	TTT	GTG	TGT	TGC	CCA	CTG	GCT	GAA	GAA	576
Asp	Lys	Phe	Arg	Gly	Val	Glu	Phe	Val	Cys	Cys	Pro	Leu	Ala	Glu	Glu	
			180					185					190			
AGT	GAC	AAT	GTG	GAT	TCT	GCT	GAT	GCG	GAG	GAG	GAT	GAC	TCG	GAT	GTC	624
Ser	Asp	Asn	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Glu	Glu	Asp	Asp	Ser	Asp	Val	
		195					200					205				
TGG	TGG	GGC	GGA	GCA	GAC	ACA	GAC	TAT	GCA	GAT	GGG	AGT	GAA	GAC	AAA	672

4/9

Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys	
210						215					220					
GTA	GTA	GAA	GTA	GCA	GAG	GAG	GAA	GAA	GTG	GCT	GAG	GTG	GAA	GAA	GAA	720
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	
225					230				235						240	
GAA	GCC	GAT	GAT	GAC	GAG	GAC	GAT	GAG	GAT	GGT	GAT	GAG	GTA	GAG	GAA	768
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	
				245				250							255	
GAG	GCT	GAG	GAA	CCC	TAC	GAA	GAA	GCC	ACA	GAG	AGA	ACC	ACC	AGC	ATT	816
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile	
			260					265						270		
GCC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACA	GAG	TCT	GTG	GAA	GAG	GTG	GTT	CGA	864
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg	
		275					280						285			
GTT	CCT	ACA	ACA	GCA	GCC	AGT	ACC	CCT	GAT	GCC	GTT	GAC	AAG	TAT	CTC	912
Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	
	290					295					300					
GAG	ACA	CCT	GGG	GAT	GAG	AAT	GAA	CAT	GCC	CAT	TTC	CAG	AAA	GCC	AAA	960
Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	
305					310					315					320	
GAG	AGG	CTT	GAG	GCC	AAG	CAC	CGA	GAG	AGA	ATG	TCC	CAG	GTC	ATG	AGA	1008
Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	
				325				330						335		
GAA	TGG	GAA	GAG	GCA	GAA	CGT	CAA	GCA	AAG	AAC	TTG	CCT	AAA	GCT	GAT	1056
Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	
			340					345						350		
AAG	AAG	GCA	GTT	ATC	CAG	CAT	TTC	CAG	GAG	AAA	GTG	GAA	TCT	TTG	GAA	1104
Lys	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	
		355					360					365				
CAG	GAA	GCA	GCC	AAC	GAG	AGA	CAG	CAG	CTG	GTG	GAG	ACA	CAC	ATG	GCC	1152
Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	
		370					375					380				
AGA	GTG	GAA	GCC	ATG	CTC	AAT	GAC	CGC	CGC	CGC	CTG	GCC	CTG	GAG	AAC	1200
Arg	Val	Glu	Ala	Met	Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	
				385		390				395					400	
TAC	ATC	ACC	GCT	CTG	CAG	GCT	GTT	CCT	CCT	CGG	CCT	CGT	CAC	GTG	TTC	1248
Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	
				405				410						415		
AAT	ATG	CTA	AAG	AAG	TAT	GTC	CGC	GCA	GAA	CAG	AAG	GAC	AGA	CAG	CAC	1296
Asn	Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	
			420					425					430			
ACC	CTA	AAG	CAT	TTC	GAG	CAT	GTG	CGC	ATG	GTG	GAT	CCC	AAG	AAA	GCC	1344
Thr	Leu	Lys	His	Phe	Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	
			435				440					445				
GCT	CAG	ATC	CGG	TCC	CAG	GTT	ATG	ACA	CAC	CTC	CGT	GTG	ATT	TAT	GAG	1392
Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	
	450					455					460					
CGC	ATG	AAT	CAG	TCT	CTC	TCC	CTG	CTC	TAC	AAC	GTG	CCT	GCA	GTG	GCC	1440



5/9

Arg 465	Met	Asn	Gln	Ser	Leu 470	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn 475	Val	Pro	Ala	Val	Ala 480	
GAG Glu	GAG Glu	ATT Ile	CAG Gln	GAT Asp 485	GAA Glu	GTT Val	GAT Asp	GAG Glu	CTG Leu 490	CTT Leu	CAG Gln	AAA Lys	GAG Glu	CAA Gln 495	AAC Asn	1488
TAT Tyr	TCA Ser	GAT Asp 500	GAC Asp	GTC Val	TTG Leu	GCC Ala	AAC Asn	ATG Met 505	ATT Ile	AGT Ser	GAA Glu	CCA Pro	AGG Arg 510	ATC Ile	AGT Ser	1536
TAC Tyr	GGA Gly	AAC Asn 515	GAT Asp	GCT Ala	CTC Leu	ATG Met	CCA Pro 520	TCT Ser	TTG Leu	ACC Thr	GAA Glu	ACG Thr 525	AAA Lys	ACC Thr	ACC Thr	1584
GTG Val	GAG Glu	CTC Leu 530	CTT Leu	CCC Pro	GTG Val	AAT Asn 535	GGA Gly	GAG Glu	TTC Phe	AGC Ser	CTG Leu 540	GAC Asp	GAT Asp	CTC Leu	CAG Gln	1632
CCG Pro 545	TGG Trp	CAT His	TCT Ser	TTT Phe	GGG Gly 550	GCT Ala	GAC Asp	TCT Ser	GTG Val	CCA Pro 555	GCC Ala	AAC Asn	ACA Thr	GAA Glu 560	AAC Asn	1680
GAA Glu	GTT Val	GAG Glu	CCT Pro 565	GTT Val	GAT Asp	GCC Ala	CGC Arg	CCT Pro 570	GCT Ala	GCC Ala	GAC Asp	CGA Arg	GGA Gly	CTG Leu 575	ACC Thr	1728
ACT Thr	CGA Arg	CCA Pro	GGT Gly 580	TCT Ser	GGG Gly	TTG Leu	ACA Thr	AAT Asn 585	ATC Ile	AAG Lys	ACG Thr	GAG Glu	GAG Glu 590	ATC Ile	TCT Ser	1776
GAA Glu	GTG Val	AAG Lys 595	ATG Met	GAT Asp	GCA Ala	GAA Glu	TTC Phe 600	CGA Arg	CAT His	GAC Asp	TCA Ser	GGA Gly 605	TAT Tyr	GAA Glu	GTT Val	1824
CAT His 610	CAT His	CAA Gln	AAA Lys	TTG Leu	GTG Val	TTC Phe 615	TTT Phe	GCA Ala	GAA Glu	GAT Asp 620	GTG Val	GGT Gly	TCA Ser	AAC Asn	AAA Lys	1872
GGT Gly 625	GCA Ala	ATC Ile	ATT Ile	GGA Gly	CTC Leu	ATG Met	GTG Val	GGC Gly	GGT Gly	GTT Val 635	GTC Val	ATA Ile	GCG Ala	ACA Thr	GTG Val 640	1920
ATC Ile	GTC Val	ATC Ile	ACC Thr	TTG Leu 645	GTG Val	ATG Met	CTG Leu	AAG Lys	AAG Lys	AAA Lys	CAG Gln	TAC Tyr	ACA Thr	TCC Ser 655	ATT Ile	1968
CAT His	CAT His	GGT Gly 660	GTG Val	GTG Val	GAG Glu	GTT Val	GAC Asp	GCC Ala 665	GCT Ala	GTC Val	ACC Thr	CCA Pro	GAG Glu 670	GAG Glu	CGC Arg	2016
CAC His	CTG Leu	TCC Ser 675	AAG Lys	ATG Met	CAG Gln	CAG Gln	AAC Asn 680	GGC Gly	TAC Tyr	GAA Glu	AAT Asn	CCA Pro	ACC Thr	TAC Tyr	AAG Lys	2064
TTC Phe 690	TTT Phe	GAG Glu	CAG Gln	ATG Met	CAG Gln	AAC Asn 695	TAG *									2088

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4: oligo

6/9

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iv) ANTI-SENS: NON

- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: -
  - (B) EMPLACEMENT:1..38

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:  
CGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC 38

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5: oligo

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 43 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iv) ANTI-SENS: NON

- (ix) CARACTERISTIQUE:
  - (A) NOM/CLE: -
  - (B) EMPLACEMENT:1..43

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:  
CCGCTCGAGTCATTGTGCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG 43

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6: oligo 8172

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iv) ANTI-SENS: NON

7/9

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: -  
(B) EMPLACEMENT:1..27

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:  
CAAAGATCTGATGCAGAATTCCGACAT 27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7: oligo 8181

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 59 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: -  
(B) EMPLACEMENT:1..59

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:  
CAAGCGGCCGCTCATCCCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCCGTTCTGCATCTGCTC59

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8: oligo 8171

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
(A) NOM/CLE: -  
(B) EMPLACEMENT:1..27

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:  
CAAAGATCTAAGAAACAGTACACATCC 27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9: oligo

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

8/9

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: -
- (B) EMPLACEMENT: 1..29

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

ccatcgatggctaCATCTTCACTTCAGAG 29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10: oligo

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: -
- (B) EMPLACEMENT: 1..31

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ccatcgatggctaTTTTTGATGATGAACTTC 31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11: oligo

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: -
- (B) EMPLACEMENT: 1..17

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCGTGGAGCTCCTCCCG 17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02278

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/47 C12N15/12 C12N5/10 C12N15/86 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XIA W ET AL: "Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: Implications for the pathogenesis of Alzheimer disease" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 94, July 1997, pages 8208-8213, XP002067171 WASHINGTON US cited in the application see the whole document	1
X A	---	23,44 2-10, 16-22, 24,25, 33,38,40
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 1999

Date of mailing of the international search report

12/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02278

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 27296 A (HSC RES DEV LP) 31 July 1997 see page 56, line 10 - page 59, line 2	1
A		11,12, 20-22, 36-38, 42-51
A	--- KIM S S ET AL: "Lack of interactions between amyloid precursor protein and hydrophilic domains of presenilin 1 and 2 using the yeast two hybrid system" JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, vol. 9, no. 1, August 1997, pages 49-54, XP002072945 TOTOWA US see the whole document	1
X	--- WEIDEMANN A ET AL.: "Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and beta amyloid precursor protein" NATURE MEDICINE., vol. 3, no. 3, March 1997, pages 328-332, XP002067172 NEW YORK US cited in the application see the whole document	21,44
A		1,24,25, 33
A	--- WO 96 34099 A (HSC RES DEV LP) 31 October 1996  see page 3, line 21 - page 10, line 17 see page 11, line 2 - page 12, line 6	1-7,11, 12, 16-19, 21-51
A	--- WO 92 13069 A (IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE TECHNOLOGY AND MEDICINE) 6 August 1992 see page 47 - page 48	1,8-10, 16,20
A	--- WARAGAI M ET AL.: "Presenilin 1 binds to amyloid precursor protein directly" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 239, 20 October 1997, pages 480-482, XP002094076 ORLANDO, FL US see the whole document	1
	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 98/02278

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WEIDEMANN A ET AL.: "Modulation of APP metabolism by presenilin-2 derivatives" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 23, no. 1-2, 25 October 1997, page 1118 XP002094077 US voir abérégé no. 443.10 ----	1-3,24, 25,33
T	HAAS C ET AL.: "A technical KO of amyloid-beta peptide" NATURE., vol. 391, 22 January 1998, pages 339-340, XP002094078 LONDON GB see the whole document ----	1
T	THINAKARAN G ET AL: "Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP" NEUROBIOLOGY OF DISEASE, vol. 4, no. 6, 1998, pages 438-453, XP002072947 NEW YORK US see the whole document -----	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02278

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9727296	A	31-07-1997	AU 1299297 A EP 0876483 A US 5840540 A AU 3251997 A WO 9801549 A	20-08-1997 11-11-1998 24-11-1998 02-02-1998 15-01-1998
WO 9634099	A	31-10-1996	AU 5394096 A CA 2219214 A CZ 9703390 A EP 0826042 A HU 9801639 A NO 974964 A PL 323109 A US 5840540 A	18-11-1996 31-10-1996 18-02-1998 04-03-1998 28-10-1998 29-12-1997 16-03-1998 24-11-1998
WO 9213069	A	06-08-1992	AU 652997 B AU 1169492 A CA 2101774 A EP 0568575 A JP 6504441 T	15-09-1994 27-08-1992 22-07-1992 10-11-1993 26-05-1994

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No  
PCT/FR 98/02278

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K14/47 C12N15/12 C12N5/10 C12N15/86 C07K16/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	XIA W ET AL: "Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: Implications for the pathogenesis of Alzheimer disease" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 94, juillet 1997, pages 8208-8213, XP002067171 WASHINGTON US cité dans la demande voir le document en entier	1
X A	---	23,44 2-10, 16-22, 24,25, 33,38,40
	---	23,44 2-10, 16-22, 24,25, 33,38,40

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/03/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 98/02278

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 97 27296 A (HSC RES DEV LP) 31 juillet 1997 voir page 56, ligne 10 - page 59, ligne 2	1
A		11,12, 20-22, 36-38, 42-51
A	--- KIM S S ET AL: "Lack of interactions between amyloid precursor protein and hydrophilic domains of presenilin 1 and 2 using the yeast two hybrid system" JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE, vol. 9, no. 1, août 1997, pages 49-54, XP002072945 TOTOWA US voir le document en entier	1
X	--- WEIDEMANN A ET AL.: "Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and beta amyloid precursor protein" NATURE MEDICINE., vol. 3, no. 3, mars 1997, pages 328-332, XP002067172 NEW YORK US cité dans la demande voir le document en entier	21,44
A		1,24,25, 33
A	--- WO 96 34099 A (HSC RES DEV LP) 31 octobre 1996  voir page 3, ligne 21 - page 10, ligne 17 voir page 11, ligne 2 - page 12, ligne 6	1-7,11, 12, 16-19, 21-51
A	--- WO 92 13069 A (IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE TECHNOLOGY AND MEDICINE) 6 août 1992 voir page 47 - page 48	1,8-10, 16,20
A	--- WARAGAI M ET AL.: "Presenilin 1 binds to amyloid precursor protein directly" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 239, 20 octobre 1997, pages 480-482, XP002094076 ORLANDO, FL US voir le document en entier	1
	--- -/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de Internationale No

PCT/FR 98/02278

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WEIDEMANN A ET AL.: "Modulation of APP metabolism by presenilin-2 derivatives" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 23, no. 1-2, 25 octobre 1997, page 1118 XP002094077 US voir abrév. no. 443.10 ---	1-3,24, 25,33
T	HAAS C ET AL.: "A technical KO of amyloid-beta peptide" NATURE., vol. 391, 22 janvier 1998, pages 339-340, XP002094078 LONDON GB voir le document en entier ---	1
T	THINAKARAN G ET AL: "Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP" NEUROBIOLOGY OF DISEASE, vol. 4, no. 6, 1998, pages 438-453, XP002072947 NEW YORK US voir le document en entier -----	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D. nde internationale No

PCT/FR 98/02278

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9727296 A	31-07-1997	AU 1299297 A	20-08-1997
		EP 0876483 A	11-11-1998
		US 5840540 A	24-11-1998
		AU 3251997 A	02-02-1998
		WO 9801549 A	15-01-1998
WO 9634099 A	31-10-1996	AU 5394096 A	18-11-1996
		CA 2219214 A	31-10-1996
		CZ 9703390 A	18-02-1998
		EP 0826042 A	04-03-1998
		HU 9801639 A	28-10-1998
		NO 974964 A	29-12-1997
		PL 323109 A	16-03-1998
WO 9213069 A	06-08-1992	US 5840540 A	24-11-1998
		AU 652997 B	15-09-1994
		AU 1169492 A	27-08-1992
		CA 2101774 A	22-07-1992
		EP 0568575 A	10-11-1993
		JP 6504441 T	26-05-1994

